Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Untersuchungen in Vivo und in Vitro über die Proteinsynthese in Rattenhirnzellkernen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Apostolos Constantin Voulgaris

aus Volos/Griechenland

1974

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Untersuchungen in Vivo und in Vitro über die Proteinsynthese in Rattenhirnzellkernen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Apostolos Constantin Voulgaris

aus Volos/Griechenland

Referent : Prof. Dr.med. Hans HERKEN

Korreferent: Prof. Dr.rer.nat. Eberhard RIEDEL

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am : 19. Juni 1974

MEINEM VATER

IN DANKBARER ERINNERUNG.

I N H A L T

I. Einleitung 1

II. Experimentelle Ergebnisse 3

A. In Vivo Studien

1. Morphologische Untersuchungen 4
2. Incorporation in vivo von ^{3}H-Leucin in die Proteine subcellulärer Fraktionen des Rattengehirns
   2,a Einbau in die nuclearen Proteine 1o
   2,b Einbau in die ribosomalen Proteine 1o
3. Incorporation in vivo verschiedener ^{3}H-markierter Aminosäuren in die nuclearen Proteine des Rattengehirns 13
4. Incorporation in vivo von ^{3}H-Leucin in die nuclearen Proteine von Neuron- und Gliakernfraktionen 15
5. Einfluß von Puromycin in vivo auf die Proteinsynthese 2o
6. Autoradiographische Ergebnisse 22

B. In vitro Studien

1. Charakteristika der nuclearen Proteinsynthese in vitro 26
2. Incorporation radioaktiver Aminosäuren in nucleare Suspensionen von Gehirn und Leber der erwachsenen Ratte 3o
3. Vergleich der Einbauraten von ^{3}H-Leucin in nucleare und ribosomale Suspensionen aus dem Gehirn erwachsener Ratten 34
4. Effekt des Puromycins auf die nucleare Proteinsynthese in vitro 36
5. Autoradiographische Befunde 38

III. Diskussion 45

IV. Material und Methoden 66

a. Chemikalien 67
b. Versuchstiere 6[illegible]
c. Injektionen 69

d. Zellfraktionierung
d,1 Kernpräparation 7o
d,2 Präparation von Neuron- und Gliazellkernen 71
d,3 Ribosomenpräparation 72
d,4 Hyaloplasma-Isolierung 73
e. Ansatz zur Messung der nuclearen Proteinsynthese 75
f. Ansatz zur Messung der ribosomalen Proteinsynthese 76
g. Durchführung der Incubation bei 37° C 76
h. Messung der Radioaktivität 78
i. Analytische Methoden (RNA-, DNA- und Proteinbestimmung) 79
j. Autoradiographische Technik 8o
k. Elektronenmikroskopische Technik 8o

V. Zusammenfassung 82

VI. Literaturverzeichnis 85

I. E I N L E I T U N G

Komplexe celluläre Funktionen erfordern einen hohen Grad struktureller Organisation. Die molekularen Träger der strukturell-funktionalen Leistungen der Zelle sind Proteine, welche Art-, Organ-, Zell-, Organellen- und Wirkungsspezifität aufweisen.

Die integrierte Kontrolle über die Funktionsabläufe der Zelle ist Aufgabe ihres genetischen Apparates, welcher im Zellnucleus residiert. Die Nucleinsäuren stellen hierbei die chemischen Substrate des genetischen Materials dar, im Sinne der Speicherung und Übertragung der Information, wodurch Struktur und Funktion der Proteine determiniert werden. Somit ist der hauptsächliche Aspekt der Biochemie des Nucleus die genetische Funktion, und gekoppelt daran erhebt sich die Frage nach den Mechanismen, welche die Zelle im Verlauf der Entwicklung veranlassen, unterschiedliche Funktionen zu übernehmen bzw. die spezifische Genaktivität regulieren und für eine selektive Transkription spezifischer Information verantwortlich sind.

Wenn auch in vielzelligen Organismen die Kontrolle der Genaktivität weitgehend unverstanden bleibt, gibt es hinreichend Anhaltspunkte für eine Beteiligung nuclearer Proteine an diesen Vorgängen.
So wurde z.B. gefunden, daß Histone, welche im Zellnucleus als DNA-Protein-Komplexe vorliegen, die messenger-RNA-Synthese regulieren, indem sie die Transkription der als Nucleohistone

vorliegenden DNA-Bereiche verhindern. (BONNER, DAHMUS, FAMBOUGH, HUANG, MARUSHIGE and TUAN, 1968).

Die Nervenzellen, welche im Laufe der Phylogenie einen bemerkenswerten Grad struktureller und funktioneller Spezialisierung erfahren haben, weisen eine lange Lebensdauer auf und zeichnen sich durch den Verlust der Fähigkeit, ihre Erbsubstanz zu replizieren, aus.
Auch Gliazellen teilen sich nur zu einem begrenzten Ausmaß und unter besonderen Umständen. (ALTMANN 1962).

In Hinblick auf diese Tatsache stellt das Gehirn eine ideale Quelle für Zellnuclei dar, deren proteinsynthetische Kapazität direkt die physiologische Aktivität der Zelle und nicht etwa die Erfordernisse der Mitose reflektiert.

Unser Interesse an der Möglichkeit einer nuclearen Proteinsynthese entspringt somit der Bedeutung nuclearer Proteine für die Regulation der Transkription genetisch codierter Information und der daraus resultierenden physiologischen Aktivität der Zelle des Zentralnervensystems von Säugetieren.

In der vorliegenden Studie sind die Grundlagen erarbeitet für weitere Untersuchungen des normalen sowie pathologischen cerebralen Proteinmetabolismus, seiner physiologischen Relevanz und nicht zuletzt seiner pharmakologischen Beeinflußbarkeit.

II. EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

A. IN VIVO STUDIEN

1. Morphologische Untersuchungen

Jede Zellkernpräparation wurde routinemäßig im Phasenkontrastmikroskop eingehend auf grobe Kontamination mit intakten Zellen sowie zur Identifizierung von differenten Kerntypen untersucht. Um weitere Kontaminationsarten auszuschließen bzw. Einblick in die nucleare Morphologie zu gewinnen, bedienten wir uns der Elektronenmikroskopie.

Dabei erwiesen sich unsere Zellkernfraktionen als frei von Mikrosomen, Mitochondrien, Zelltrümmern, Bakterien und Myelin; lediglich an den nur in hochmolaren Saccharose-Medien gereinigten Kernen befanden sich stellenweise noch Teile der äußeren Kernmembran Abb. 1.
Die äußere Schicht der nuclearen Membran wird aber entsprechend den Ausführungen von SJÖSTRAND, 1964, als Teil des endoplasmatischen Reticulums angesehen und kann demzufolge mit Ribosomen beladen sein.

Bei den in Saccharose-Detergens-Medien gereinigten Nuclei ist die äußere Lage der Kernmembran vollkommen entfernt worden, samt ribosomenähnlichen Partikeln, die in ihr angeheftet vorkommen können. Die nucleare Morphologie bleibt dabei in jeder Hinsicht erhalten Abb. 2.

Einen repräsentativen Ausschnitt von Gehirnnuclei, in Saccharose-Detergens-Medien behandelt, demonstriert Abb. 3. Die Reinheit der Präparation ist offensichtlich.

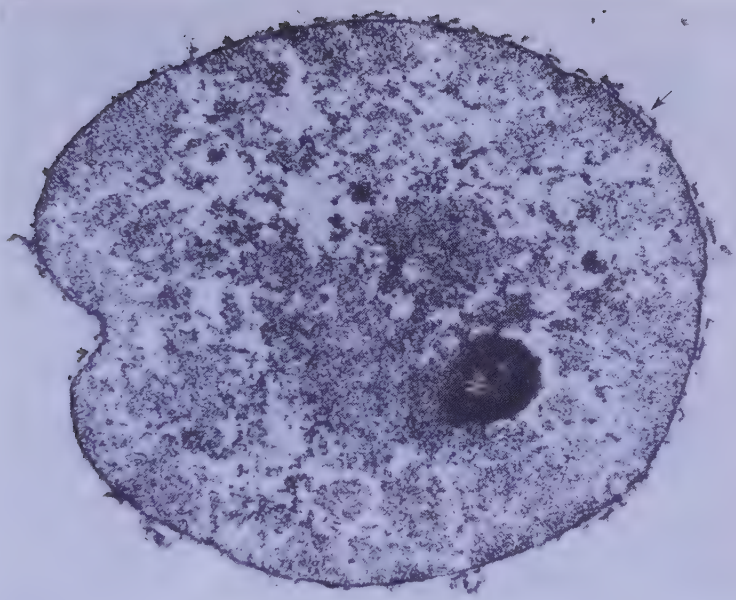


Abb. 1 Elektronenmikroskopisches Bild eines Gehirnzellkerns nur mit hypertonischer Saccharose-Lösung (ohne Detergenz-Behandlung) gereinigt. (Dr. Fleischer) Die Doppelmembran, die stellenweise gut erhalten ist, läßt cytoplasmatische Verunreinigungen erkennen. Das Nucleoplasma ist grob granulär und enthält einen peripher gelegenen Nucleolus.

Fixation: mit 3 % Glutaraldehyd-Lösung

Vergrößerung: 1 : 25ooo

Prof. H.-J. MERKER Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin

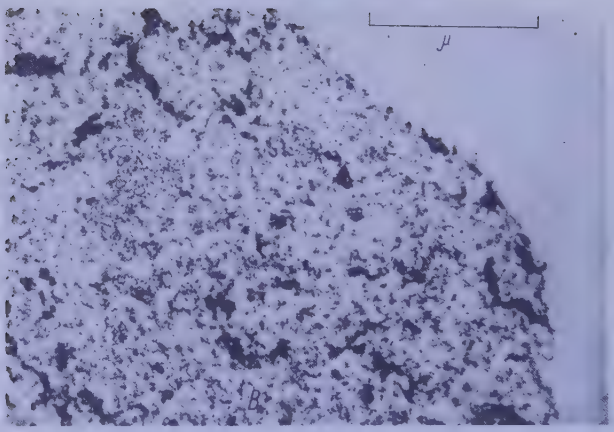


Abb. 2 Stärkere Vergrößerung eines Gehirnzellkerns, wahrscheinlich neuronalen Ursprungs, nach Triton-X-1oo Behandlung. (Dr. Fleischer)
Der innere Anteil der Zellkernmembran zeigt eine granuläre Strukturierung. Die äußere Schicht sowie cytoplasmatische Verunreinigungen sind komplett entfernt worden. Porenähnliche Öffnungen sind stellenweise erkennbar.
Fixation: 3 proz. Glutaraldehyd
Vergrößerung: 1 : 35ooo
Prof. H.-J. MERKER Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin

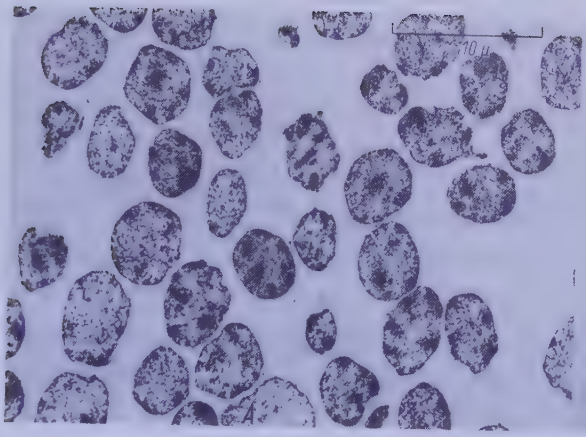


Abb. 3 Elektronenmikroskopisches Übersichtsbild von einer mit hypertonischer Saccharose-Lösung gereinigten und mit Triton-X-1oo behandelten Zellkernfraktion. (Dr. Fleischer)
Vergrößerung: 1 : 3ooo
Fixation: mit 3 proz. Glutaraldehyd
Präparation wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.
Prof. H.-J. MERKER Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin

Unsere Messungen der nuclearen DNA und RNA stimmen mit dem Ergebnis der optischen Untersuchungen überein. In einer Serie von Experimenten betrug der Quotient RNA : DNA für Gehirnnuclei o,o88 $\pm$ o,o2. (Für Lebernuclei o,o98 $\pm$ o,o3.)

Vergleicht man diesen Wert mit denen anderer Autoren Tab. 1, so wird ersichtlich, daß der Quotient unserer Gehirnkernpräparation weitaus der niedrigste ist. Im Falle hoher Zahlenwerte für RNA : DNA Quotienten muß man speziell eine mikrosomale Verunreinigung annehmen. (SIEBERT, HUMPHREY, THEMANN & KERSTEN, 1965).

Tab. 1 RNA : DNA Relationen in Gehirnzellnuclei

Autor		RNA:DNA
HADJIOLOV, TENCHEVA, BOJADJIEVA, MIKHAILOVA 1965	mit Triton	o,4
LØVTRUP-REIN and McEWEN 1966	ohne Triton	o,46
	mit Triton	o,37
KATO, KUROKAWA 1967	ohne Triton	o,42
BURDMAN and JOURNEY 1969	ohne Triton	o,62
	mit Triton	o,16
FLEISCHER-LAMBROPOULOS, REINSCH 1971	mit Triton	o,o88
	ohne Triton	o,o98
Eigene Versuche	mit Triton	o,o88

2. Incorporation in vivo von ^{3}H-Leucin in die Proteine subcellulärer Fraktionen des Rattengehirns

a) Einbau in die nuclearen Proteine

Nach einer einmaligen intravenösen Injektion von 1 μCi/g Körpergewicht ^{3}H-Leucin (spez. Aktivität 22 Ci/mMol) wurde die proteingebundene Radioaktivität während 15 bis 3oo Min. nach der Application bestimmt, da zahlreiche Vorversuche gezeigt haben, daß innerhalb dieses Intervalls die Spitze für die radioaktive Markierung von unfraktioniertem Cortex cerebri lag.
Die Incorporationsrate wurde in dpm/mg Protein ausgedrückt.

Wie aus der Abb. 4 ersichtlich ist, steigt die Einbaurate in den nuclearen Proteinen mit der Zeit an und erreicht bei 6o Min. nach der Injektion den maximalen Wert.

b) Einbau in die ribosomalen Proteine

Zum Vergleich wurde die extranucleäre, ribosomale Proteinsynthese untersucht.
Hierbei zeigte sich bei 15 Min. nach der Application von ^{3}H-Leucin eine um 2,1 mal höhere Incorporationsrate in der ribosomalen als in der nuclearen Fraktion.

In der darauffolgenden Zeit sinkt die Einbaurate in den Ribosomen wesentlich ab.
Tab. 2 demonstriert unsere Ergebnisse.

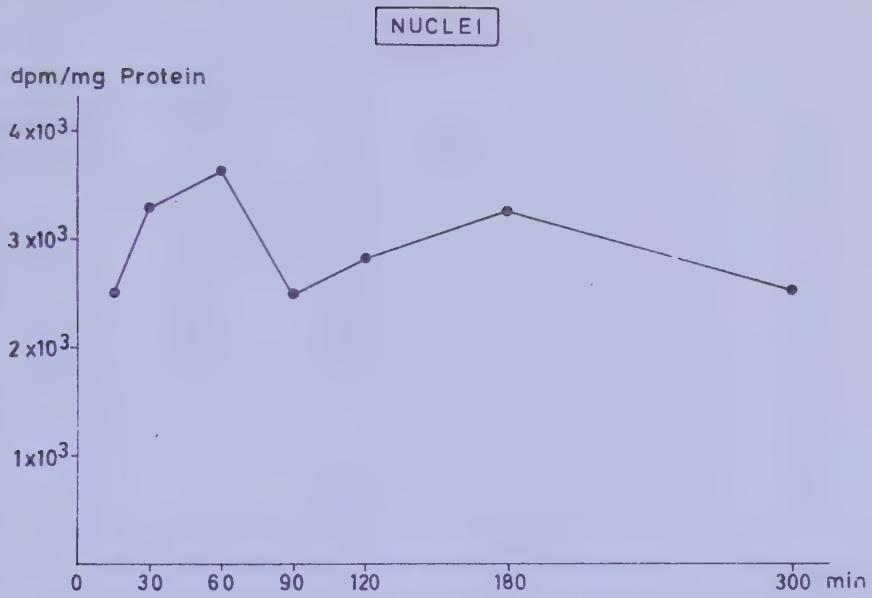


Abb. 4 Incorporation in vivo von ^{3}H-Leucin in die nuclearen Proteine von Rattengehirnen

Proteingebundene Radioaktivität in der Zellkernfraktion von Rattengehirnen nach einmaliger intravenöser Injektion von 1 µCi/g Kg ^{3}H-Leucin (spez. Aktivität 22 Ci/mMol) und Tötung der Tiere zu verschiedenen Zeiten nach der Application.
Kernpräparation und Radioaktivitätsmessung sind im Abschnitt "Material und Methoden" ausführlich beschrieben.
Die Zahlen dokumentieren Mittelwerte von 5 bis 7 Experimenten.

Tab. 2

Incorporation in vivo von ^{3}H-Leucin in die nuclearen und ribosomalen Proteine von Rattengehirnen: Vergleich der Einbauraten.

	Zeit nach intravenöser ^{3}H-Leucin Injektion		
Präparation	15 Min.	3o Min.	6o Min.
Nuclei	25oo ± 81	3287 ± 7o	365o ± 9o
Ribosomen	5357 ± 2o8	4553 ± 414	3468 ± 216
Ribosomen / Nuclei	2,14	1,39	o,95

Proteingebundene Radioaktivität in der nuclearen und ribosomalen Fraktion von Rattengehirnen nach einmaliger, intravenöser Injektion von 1 µCi/g Körpergewicht ^{3}H-Leucin (spez. Aktivität 36 Ci/mMol) und Tötung der Tiere zu verschiedenen Zeiten nach der Application.
Subcelluläre Fraktionierung sowie Radioaktivitätsmessung sind im Abschnitt "Material und Methoden" ausführlich beschrieben.
Die Zahlen dokumentieren Mittelwerte mit Standardabweichung von 3 bis 5 Experimenten.
Die Berechnung erfolgte mit einem programmierten Elektronenrechner der Firma Hewlett-Packard, Typ 981o A.

3. Incorporation in vivo verschiedener ^{3}H-markierter Aminosäuren in die nuclearen Proteine des Rattengehirnes.

^{3}H-Leucin (spez. Aktivität 36 Ci/mMol)
^{3}H-Tyrosin (spez. Aktivität 31 Ci/mMol)
^{3}H-Lysin (spez. Aktivität 3o Ci/mMol)
^{3}H-Glutaminsäure (spez. Aktivität 15 Ci/mMol)
^{3}H-Asparaginsäure (spez. Aktivität 18 Ci/mMol)

haben wir separat hinsichtlich ihres Einbaues in die nuclearen Proteine des Gehirnes erwachsener Ratten untersucht.
Die Dosis betrug 1 µCi/g Körpergewicht.
Die Incorporationsrate, in dpm/mg Protein ausgedrückt, bezogen wir auf die Radioaktivitätsmessung 6o Min. nach der intravenösen Application der zur Prüfung gestandenen Aminosäure, da bereits während dieses Intervalls die Markierung den maximalen Wert erreicht.
Dabei zeigte ^{3}H-Leucin die höchste Einbaurate. ^{3}H-Tyrosin rangiert an zweiter Stelle.
Die in vivo Incorporation von ^{3}H-Asparaginsäure und ^{3}H-Glutaminsäure ist minimal. Aus diesem Grunde eignen sich diese Aminosäuren nicht zur Analyse des nuclearen Proteinstoffwechsels.

Vergleichende Untersuchungen führten wir auch mit Zellkernen der Rattenleber durch. Hierbei zeigte ^{3}H-Leucin ebenfalls die höchste Einbaurate. Unsere Ergebnisse werden in Tab. 3 zusammenfassend dargestellt.

Tab. 3

Incorporation in vivo ^{3}H-markierter Aminosäuren in die nuclearen Proteine von Gehirn und Leber der erwachsenen Ratte.

Radioaktive Aminosäure	Incorporation in dpm/mg Protein Gewebe	
	Gehirn	Leber
^{3}H-Leucin (spez. Akt. 36 Ci/mMol)	3540 ± 60	2993 ± 412
^{3}H-Tyrosin (spez. Akt. 31 Ci/mMol)	2325 ± 97	2040 ± 434
^{3}H-Lysin (spez. Akt. 30 Ci/mMol)	277 ± 65	427 ± 49
^{3}H-Glutaminsäure (spez. Akt. 15 Ci/mMol)	85 ± 9	519 ± 48
^{3}H-Asparaginsäure (spez. Akt. 18 Ci/mMol)	120 ± 18	97 ± 16

Proteingebundene Radioaktivität in der Zellkernfraktion von Gehirn und Leber nach einmaliger intravenöser Injektion von 1 µCi/g Körpergewicht der jeweiligen ^{3}H-markierten Aminosäure und Tötung der Tiere 60 Min. nach der Application. Kernpräparation und Radioaktivitätsmessung sind im Abschnitt "Material und Methoden" ausführlich beschrieben.
Die Zahlen dokumentieren Mittelwerte mit Standardabweichung von 4 bis 5 Experimenten. Die Berechnung erfolgte mit einem programmierten Elektronenrechner der Firma Hewlett-Packard, Typ 9810 A.

4. Incorporation in vivo von ^{3}H-Leucin in die nuclearen Proteine von Neuron- und Gliakernfraktionen.

Eine beträchtliche Schwierigkeit bei der Analyse des Stoffwechsels des ZNS stellt zweifellos die Heterogenität seiner Zellpopulation dar.
Morphologisch wie auch funktionell werden generell trotz zahlreicher Variationen zwischen mehreren Untergruppen, zwei Zelltypen voneinander unterschieden, Neuronen und Gliazellen.

Nach zahlreichen Vorversuchen ist es uns gelungen, mit Hilfe der diskontinuierlichen Gradienten-Ultrazentrifugation eine Fraktion mit vorwiegend großen Kernen und aufgelockertem Nucleoplasma Abb. 5, von einer Fraktion mit kleineren und dichteren Kernen Abb. 6 zu trennen. Vergleiche mit entsprechenden Schnittpräparaten im Licht- und Elektronenmikroskop erlauben die Zuordnung der kleineren Kerntypen zu den Gliazellen, während die großen Kerne neuronalen Ursprungs sein dürften.

Die Zellkernfraktionen wurden auch durch das Protein/DNA-Verhältnis charakterisiert. Die Relation betrug bei den kleineren Kernen 2,53 ; bei den größeren Kernen 4,12.

Der Aminosäureeinbau in die nuclearen Proteine von Neuron- und Gliakernfraktionen wurde anhand von ^{3}H-Leucin (spez.Akt. 22 Ci/mMol) nach einmaliger intravenöser Injektion von 1 μCi/g Körpergewicht und Dekapitation der Tiere 3o Min. nach der Application untersucht.

Aus quantitativen Gründen waren pro Experiment 3o Ratten erforderlich.

Unsere Ergebnisse sind in Abb. 7 wiedergegeben. Demnach liegt die Incorporationsrate von ^{3}H-Leucin bei den Neuronen um 1,8 mal höher als bei den Gliazellkernen.

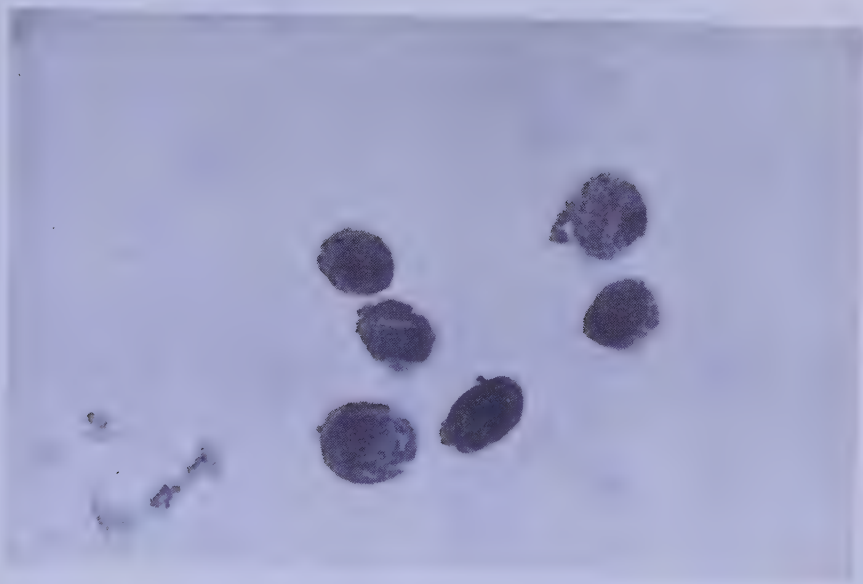


Abb. 5 Neuronenkerne, gewonnen durch diskontinuierliche Gradienten-Ultrazentrifugation einer reinen Zellkernfraktion von 3o Rattengehirnen. Schichtung in der Trennlinie der 2,5 und 2,4 M-Saccharose.
Die Neuronenkerne sind groß und zeigen ein aufgelockertes Nucleoplasma.
Präparation wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.
Fixation: mit 3 % Glutaraldehyd-Lösung
Vergrößerung: 1 : 25oo
Prof. H.-J. MERKER Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin

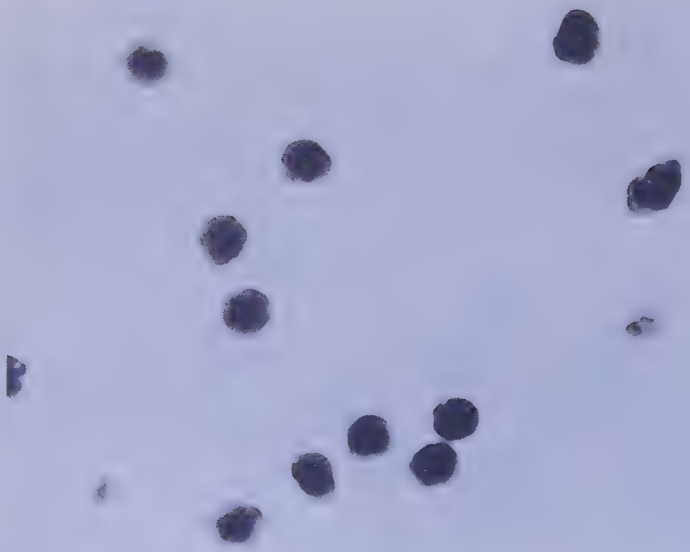


Abb. 6 Gliakerne, erhalten durch diskontinuierliche Gradienten-Zentrifugation der reinen Zellkernfraktion von 3o Rattengehirnen.
Schichtung in der Trennlinie der 2,5 und 2,6 M-Saccharose. Gliakerne sind klein und dunkel. Präparation wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.
Fixation: mit 3 % Glutaraldehyd-Lösung
Vergrößerung: 1 : 25oo
Prof. H.-J. MERKER Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin

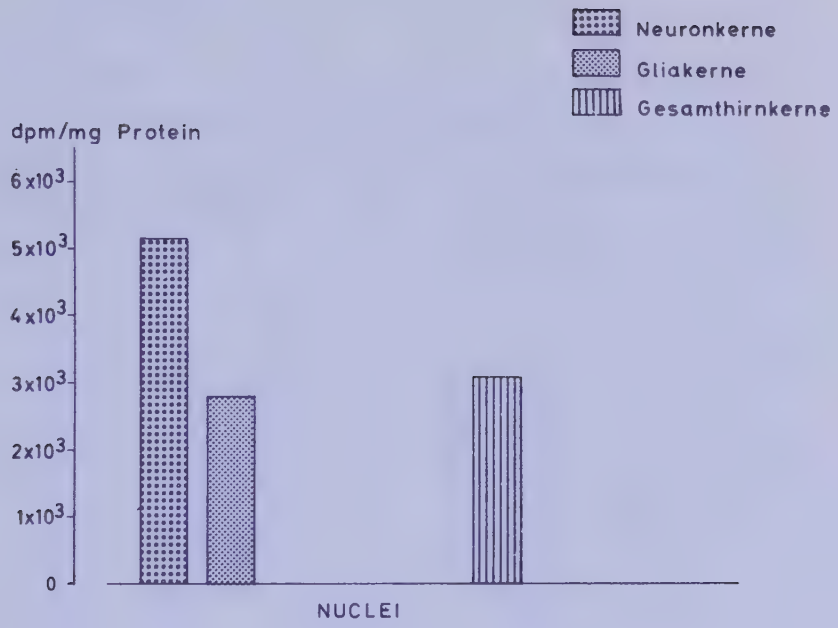


Abb. 7 Incorporation in vivo von ^{3}H-Leucin in die nuclearen Proteine von Neuron- und Gliakernfraktionen

Proteingebundene Radioaktivität nach einmaliger intravenöser Injektion von 1 µCi/g Körpergewicht ^{3}H-Leucin (spez.Aktivität 22 Ci/mMol) und Tötung der Tiere 3o Min. nach der Application.
Jeder Versuch verlangte 3o Ratten.
Nuclei wurden von Gehirnzellen isoliert und die Fraktionierung in Neuron- und Gliakerne erfolgte durch diskontinuierliche Saccharose-Ultrazentrifugation.
Der Gradient bestand aus 3 ml 2,6 M, 15 ml 2,5 M, 1o ml 2,4 M und 2 ml 2,3 M Saccharose.
Ausführliche Beschreibung im Abschnitt "Material und Methoden"
Die Zahlen repräsentieren Mittelwerte von 3 Experimenten.

5. Einfluß von Puromycin in vivo auf die Proteinsynthese

Die Incorporation von ^{3}H-Leucin (spez.Akt. 36 Ci/mMol) in die Trichloressigsäure-unlöslichen nuclearen Proteine des Rattengehirns wurde nach einmaliger intraventriculärer Application von Puromycin (in isotoner NaCl-Lösung gelöst) untersucht. Ergebnis s. Tab. 4.

Bis zum Zeitpunkt der Tötung befanden sich die Versuchstiere in ausgezeichneter Verfassung. Eine Alteration der motorischen Aktivität wurde nicht beobachtet.
Die Kontrolltiere erhielten intraventriculär isotone NaCl-Lösung.

Tab. 4 Hemmender Effekt des Puromycins auf die in vivo Incorporation von ^{3}H-Leucin in die nuclearen Proteine des Rattengehirns.

Präparation	In vivo Behandlung Incorporation in dpm/mg Protein		
	^{3}H-Leucin i.v. 1 µCi/g	Puromycin o,o1 mg/g intraventriculär + ^{3}H-Leucin 1 µCi/g	Hemmung
Gehirnnuclei	334o	154o	54 %
	364o	2o5o	44 %

Zu einem gegebenen Zeitpunkt applizierten wir intraventriculär o,o1 mg Puromycin/g Körpergewicht in einem Gesamtvolumen von 5o µl, während die Kontrolltiere isotone NaCl-Lösung (o,154 M-NaCl) erhielten.
Die Injektionstechnik ist im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.
12o Min. nach der Puromycin- bzw. NaCl-Injektion verabreichten wir intravenös (i.v.) 1 µCi/g Körpergewicht ^{3}H-Leucin (spez. Aktivität 36 Ci/mMol).
Die Tiere wurden 6o Min. später getötet.
Kernpräparation sowie Radioaktivitätsmessung sind im Abschnitt "Material und Methoden" dargestellt.

6. Autoradiographische Ergebnisse

Die autoradiographische Reaktion nach Application radioaktiver Aminosäuren informiert über die Größe der Eiweißneubildung sowie auch über den Ort, an dem die Synthese abläuft oder am intensivsten ist.
Für unsere Untersuchung verwendeten wir ^{3}H-Leucin, wegen der sehr kleinen Reichweite der ß-Strahlung dieses Isotops. Dadurch wird eine sichere Zuordnung der Silberkörner zu einzelnen Zellstrukturen gewährleistet.

3o µCi/g Körpergewicht ^{3}H-Leucin (spez. Aktivität 46,9 Ci/mMol) wurde durch zwei intravenöse Injektionen in 3o min. Abstand appliziert. Die Tötung der Tiere erfolgte 6o Min. nach der letzten Injektion.
Der Applikationsmodus wurde mit der Absicht gewählt, mögliche Effekte der intracellulären Umverteilung der Markierung während der Untersuchungsperiode aufzuheben. Das Autoradiogramm der Abb. 8 offenbart die Radioaktivität, innerhalb des Nucleus verteilt. Alle Kerntypen sind markiert, wenn auch in unterschiedlicher Proportionalität. Die Auszählung der Silberkörner erlaubt exakte quantitative Aussagen. Diese aufwendigen Messungen gehen jedoch über den Rahmen unserer Arbeit hinaus.
Abb. 9 demonstriert die ^{3}H-Leucin-Incorporation nach intraventriculärer Application von o,o1 mg/g Körpergewicht Puromycin. Die Abnahme der Markierung ist offensichtlich; eine Tatsache, die mit der bereits schon beschriebenen Hemmung der in vivo Proteinsynthese gut übereinstimmt.

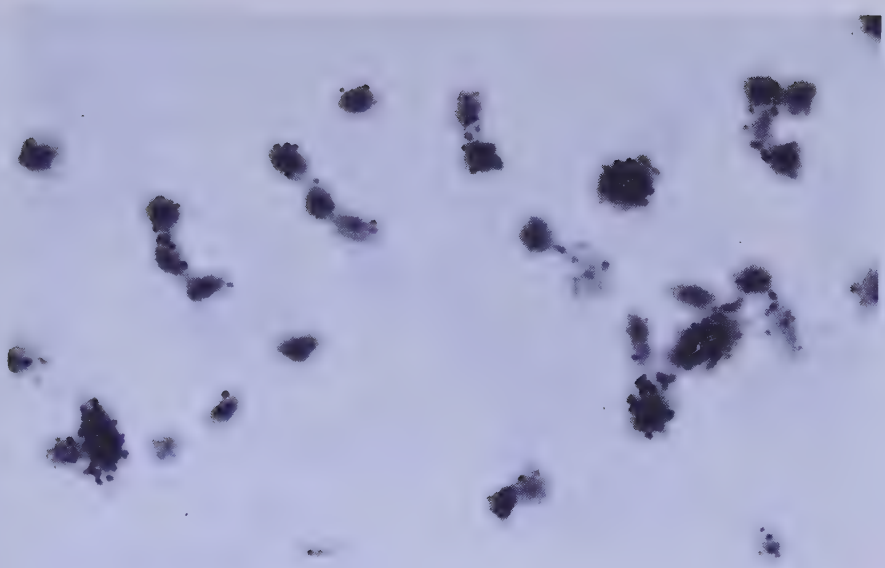


Abb. 8 Lichtmikroskopisches Emulsionsautoradiogramm von Gehirnnuclei der erwachsenen Ratte nach Applikation von 3o μCi/g Körpergewicht ^{3}H-Leucin (spez. Akt. 46,9 Ci/mMol) durch zwei intravenöse Injektionen in 3o min. Abstand. Tötung der Tiere 6o Min. nach der letzten Injektion. Kernpräparation sowie autoradiographische Technik wie bereits im Abschnitt "Material und Methoden" ausführlich beschrieben.

Fixierung: mit 3 proz. Glutaraldehyd-Lösung

Vergrößerung: 1 : 25oo

Expositionszeit: 2 Wochen

Prof. H.J. MERKER Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin

Abb. 9 Lichtmikroskopisches Emulsionsautoradiogramm von Gehirnnuclei der erwachsenen Ratte nach Vorbehandlung mit Puromycin. Zu einem gegebenen Zeitpunkt applizierten wir intraventriculär o,o1 mg Puromycin/g Körpergewicht in einem Gesamtvolumen von 5o µl. 12o Min. später erfolgte die Verabreichung von 3o µCi/g Körpergewicht ^{3}H-Leucin (spez.Akt. 46,9 Ci/mMol) durch zwei i.v. Injektionen in 3o min. Abstand. Tötung der Tiere 6o Min. nach der letzten Injektion.

Fixierung: mit 3 proz. Glutaraldehyd-Lösung

Vergrößerung: 1 : 25oo

Expositionszeit: 2 Wochen

Prof. H.-J. MERKER Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin

B. IN VITRO STUDIEN

1. Charakteristika der nuclearen Proteinsynthese in vitro

Morphologisch intakte und metabolisch aktive Nuclei aus Gehirn und Leber der Ratte, mit hypertoner Saccharose und Triton-X-1oo gereinigt, sind zur Incorporation ^{3}H - markierter Aminosäuren in die Trichloressigsäure-unlöslichen Proteine fähig.

In unserer Arbeitsgruppe haben wir gefunden, daß sich die maximale Aminosäureaufnahme in vitro über einem ziemlich engen pH-Bereich ereignet. Das pH-Optimum für unser Einbau-System liegt bei pH 6,75 bis 7,o. In der Tab. 5 werden die pH-Werte aufgestellt, die von verschiedenen Autoren für die Proteinsynthese von Rattengehirnzellnuclei angegeben wurden.

Zur optimalen Incorporation ist die Anwesenheit divalenter Kationen im Incubationsansatz unerläßlich. Mg-Ionen sind erforderlich, um eine Agglutination der Kerne während längerer Incubationsperioden zu verhindern. Ca-Ionen stabilisieren die Homogenität der Zellkernfraktion. Monovalente Kationen wie Na oder K stimulieren den Einbau unerheblich.

Zusatz kleiner Mengen von ATP bis zu o,15 m M in unserer Versuchsanordnung vermag die Aktivität der Aminosäureincorporation nur geringfügig zu beeinflussen. Mit zunehmender ATP-Konzentration wird der Einbau gehemmt, kann aber durch gleichzeitige Gabe von Mg-Ionen ausgeglichen werden. Offenbar beruht der Hemmeffekt auf der Bildung eines Mg - ATP - Komplexes, wobei Mg nicht mehr in ausreichender Kon-

zentration für die Reaktionen der Proteinsynthese zur Verfügung steht.

Als ATP-regenerierendes System wurden im Incubationsansatz Phosphoenolpyruvat und Pyruvatkinase zugesetzt, wodurch auch bei längeren Incubationsperioden eine konstante ATP-Konzentration gewährleistet wird und somit der Zusatz hoher hemmender ATP-Mengen vermieden werden kann.

Das Fehlen des cytoplasmatischen 1o5ooo xg-Überstandes oder des ATP-regenerierenden Systems bewirkte jeweils eine Hemmung der Incorporationsrate von 8o - 9o %. (FLEISCHER, LAMBROPOULOS und REINSCH 1971).

Eine Zunahme der Incorporation von ^{3}H-Leucin (spez.Akt. 36 Ci/mMol) wurde beobachtet bei Incubation von Rattengehirnzellnuclei während 15 und 3o Min. mit ansteigenden Radioaktivitätsmengen. Abb. 1o.

Tab. 5 pH-Werte, die von verschiedenen Autoren für Proteinsynthesen von Gehirnzellnuclei angegeben wurden.

Autor	pH-Wert
INAMURA, KATO, KUROKAWA 1968	7,o
BURDMAN, JOURNEY 1969	6,5
LØVTRUP-REIN 197o	7,4
HAMBERGER, BLOMSTRAND, YANAGIHARA 1971	7,6
FLEISCHER-LAMBROPOULOS, REINSCH 1971	6,75
HAGLID 1971	6,5

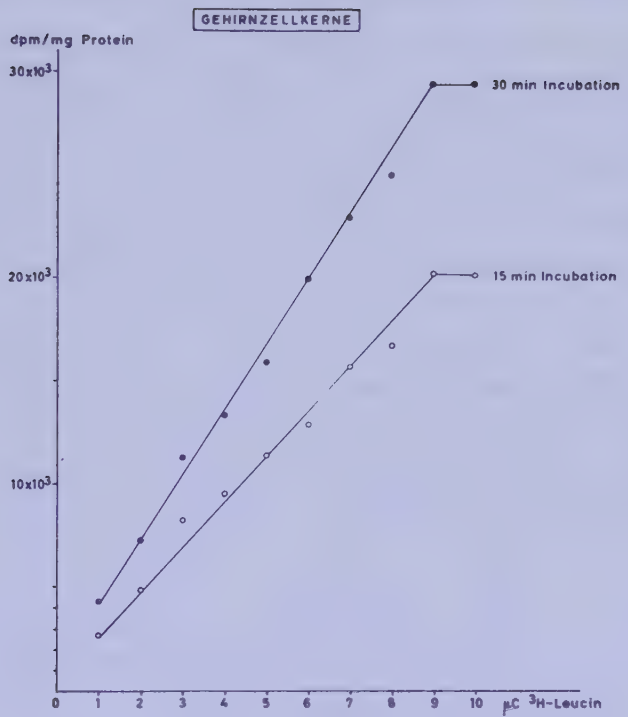


Abb. 1o Verhältnis zwischen proteingebundener Radioaktivität und ansteigendem Isotopengehalt des Incubationsansatzes (in vitro).

Gehirnzellnuclei wurden während 15 und 3o Min. mit den angezeigten ^{3}H-Leucin-Mengen (spez.Aktivität 36 Ci/mMol) in vitro bei 37 ^{o} C incubiert.
Das Incubationsvolumen betrug o,5 ml.
Einzelheiten der Incubation sowie Radioaktivitätsmessung s. Abschnitt "Material und Methoden".

2. Incorporation radioaktiver Aminosäuren in nucleare Suspensionen von Gehirn und Leber der erwachsenen Ratte.

^{3}H-Leucin (spez. Aktivität 36 Ci/mMol)
^{3}H-Tyrosin (spez. Aktivität 31 Ci/mMol)
^{3}H-Lysin (spez. Aktivität 3o Ci/mMol)
^{3}H-Asparaginsäure (spez. Aktivität 18 Ci/mMol)
^{3}H-Glutaminsäure (spez. Aktivität 15 Ci/mMol)
wurden in vitro hinsichtlich ihres Einbaues in Gehirnzellnuclei von Ratten getestet. Die Zeitabhängigkeitskurve wird in Abb. 11 wiedergegeben. Demnach steigt die Incorporationsrate mit der Zeit bis 15 Min. nahezu linear an und erreicht den maximalen Wert bei 6o Min., während die proteingebundene Radioaktivität für weitere 6o Min. der Incubation unverändert bleibt.

Diese Kinetik des Einbaues schließt eine kontinuierliche Proteinsynthese durch ganze Zellen, Zellfragmente, Bakterien oder Mitochondrien, sowie eine extensive Proteolyse, während längerer Incubationsperioden aus.
Keine Verzögerungsphase wurde beobachtet.

Lysin, Asparagin- und Glutaminsäure wurden in sehr geringem Ausmaß eingebaut. Die Relation zwischen dem Einbau von Leucin und den anderen Aminosäuren blieb in allen Versuchen konstant.

Vergleichende Untersuchungen mit Leberzellkernen von Ratten wurden durchgeführt. In Abb. 12 wird die Kinetik der Incorporation wiedergegeben. Es ist ersichtlich, daß Gehirnzellnuclei beim Einbau markierter Aminosäuren aktiver sind als Leberzellnuclei.

Tab. 6 zeigt, daß Gehirnzellnuclei beim Einbau von ^{3}H-Leucin 2,3 bis 3,6 mal so aktiv waren wie Leberzellnuclei.

Die unterschiedliche Kapazität bezüglich der Proteinsynthese in vitro weist auf biologische Eigentümlichkeiten von Gehirn- und Leberzellnuclei hin und dürfte wohl nicht auf methodologischen Unzulänglichkeiten beruhen, da Präparationstechnik sowie Incubationsbedingungen für beide nucleare Systeme gleich waren.

Tab. 6 Incorporation von ^{3}H-Leucin in isolierte Nuclei von Gehirn und Leber der Ratte (dpm/mg Protein)

Gewebe	15 Min. Incubation		3o Min. Incubation	
Leber	3224	3591	3822	3644
Gehirn	7684	9898	13756	11887
Gehirn/Leber	2,3	2,7	3,6	3,2

Nuclei, mit Triton-X-1oo und hypertonischer Saccharose gereinigt, wurden während 15 und 3o Min. mit 3 ´ µCi/o,5 ml Ansatz ^{3}H-Leucin (spez.Akt. 36 Ci/mMol) bei 37^{o}C in vitro incubiert.
Das Incubationsvolumen betrug 1,o ml.
Einzelheiten der Incubation sowie Radioaktivitätsmessung s. Abschnitt "Material und Methoden".

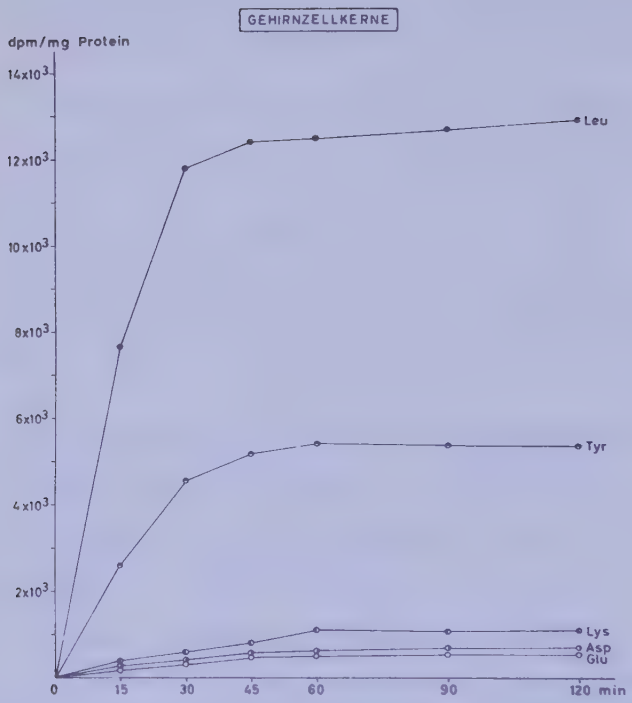


Abb. 11 Kinetik der Incorporation katalysiert durch Gehirnzellnuclei.

Nuclei mit Triton-X-1oo und hypertonischer Saccharose gereinigt, wurden mit ^{3}H-markierten Aminosäuren bei 37° C incubiert. Das Incubationsvolumen betrug 1 ml. Die Proben enthielten o,25o ml Kernsuspension und jeweils 3 µCi/o,5 ml Ans. ^{3}H-Leucin (sp.Akt. 36 Ci/mMol) oder ^{3}H-Tyrosin 3 µCi/o,5 ml Ans. (sp.Akt. 31 Ci/mMol) oder ^{3}H-Lysin 3 µCi/o,5 ml Ans. (sp.Akt. 3o Ci/mMol) oder ^{3}H-Asparaginsäure 5 µCi/o,5 ml Ans. (sp.Akt. 18 Ci/mMol) oder ^{3}H-Glutaminsäure 5 µCi/o,5 ml Ans. (sp.Akt. 15 Ci/mMol). Weitere Einzelheiten der Incubation sowie Radioaktivitätsmessung s. Abschnitt "Material und Methoden".

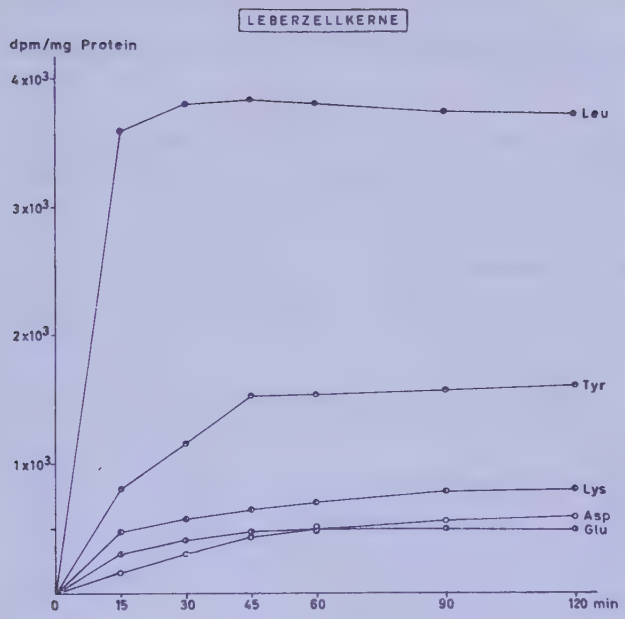


Abb. 12 Kinetik der Incorporation katalysiert durch Leberzellnuclei der Ratte

Nuclei mit Triton-X-1oo und hypertonischer Saccharose gereinigt, wurden mit ^{3}H-markierten Aminosäuren incubiert. Das Incubationsvolumen betrug 1 ml. Die Proben enthielten: o,25 ml Kernsuspension und jeweils 3 µCi/o,5 ml Ansatz ^{3}H-Leucin (36 Ci/mMol), 3 µCi/o,5 ml Ans. Tyrosin (sp.Akt. 31 Ci/mMol), 3 µCi/o,5 ml Ans. Lysin (sp.Akt. 3o Ci/mMol), 5 µCi/o,5 ml Ans. Asparaginsäure (sp.Akt. 18 Ci/mMol), 5 µCi/o,5 ml Ans. ^{3}H-Glutaminsäure (sp.Akt. 15 Ci/mMol). Weitere Einzelheiten der Incubation sowie Radioaktivitätsmessung s. Abschnitt "Material und Methoden".

3. Vergleich der Einbauraten von ^{3}H-Leucin in nucleare und ribosomale Suspensionen aus dem Gehirn erwachsener Ratten.

In einer Reihe von Experimenten wurde die ribosomale Proteinsynthese untersucht und quantitative Vergleiche mit nuclearen Präparationen gezogen.
Hierbei wurden ribosomale bzw. nucleare Suspensionen während 15 bis 6o Min. mit ^{3}H-Leucin incubiert.

Die maximale Incorporation ereignete sich in der ribosomalen Fraktion. Tab. 7
Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität der incorporierten Aminosäure zeigen isolierte ribosomale Fraktionen eine um 9,5 mal höhere proteinsynthetische Aktivität als nucleare Systeme.

Im Gegensatz zu unseren in vivo Resultaten - vergleiche hierzu Tab. 2 - nimmt mit ansteigender Incubationszeit die Aminosäureincorporation in die ribosomalen Proteine zu.

Tab. 7

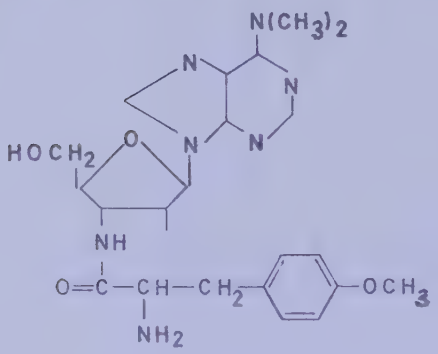
Incorporation in vitro von ^{3}H-Leucin in nucleare und ribosomale Präparationen vom Rattengehirn: Vergleich der Einbauraten.

	Incubationszeit		
Präparation	15 Min.	3o Min.	6o Min.
Nuclei	7684 ± 255	11887 ± 375	134o6 ± 6o3
Ribosomen	94143 ± 2549	157829 ± 4369	21o286 ± 4775

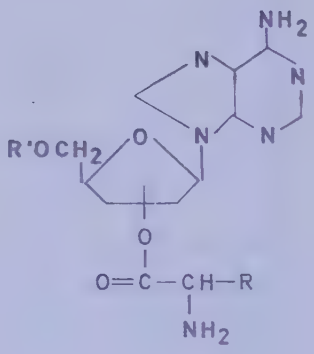
Nuclei bzw. Ribosomen wurden während 15, 3o und 6o Min. bei 37 °C im entsprechenden Incubationsansatz incubiert.
Das Incubationsvolumen betrug o,5 ml.
Die Proben enthielten o,125 ml Kern- bzw. o,1 ml Ribosomensuspension und 3 µCi ^{3}H-Leucin (Spez.Aktivität 36 Ci/mMol).
Weitere Bestandteile wie Einzelheiten der Incubation siehe "Material und Methoden".
Die Ergebnisse sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei Versuchen.

4. Effekt des Puromycins auf die nucleare Proteinsynthese in vitro.

Puromycin, ein Antibiotikum aus Streptomyces purum bzw. alboniger, unterbricht die Proteinsynthese, indem es die wachsende Peptidkette vom Ribosom ablöst. Dies ergibt sich aus seiner chemischen Struktur. (YARMOLINSKY, de la HABA 1959). Abb. 13



Puromycin



Transfer RNA-amino acid

Als Antimetabolit der Amino acyl-transfer RNA wird es anstelle einer Aminosäure an das Carboxylende der wachsenden Peptidkette gebunden, kann aber mit der nachfolgenden Amino acyl-transfer RNA nicht mehr reagieren.
Dadurch wird der Polymerisationsprozeß frühzeitig beendet und es kommt zur Freisetzung des Proteinbruchstücks vom Ribosom (HULTIN 1961; MORRIS 1961; GILBERT 1963; NATHANS 1964).
Tab. 7 zeigt den Effekt des Puromycins auf die nucleare Proteinsynthese. Eine Hemmung von über 9o % wurde beobachtet.

Tab. 8 Hemmender Effekt des Puromycins auf die in vitro Incorporation von ^{3}H-Leucin in die nuclearen Proteine des Rattengehirns.

	dpm/mg Kernprotein nach 6o Min. Incubation	Hemmung der Incorporations-rate
Kompletter Ansatz + 5 μCi ^{3}H-Leucin/o,5 ml	228oo	o
Kompletter Ansatz + 5 μCi ^{3}H-Leucin + 15oγ Puromycin	188o	92 %
Kompletter Ansatz + 1o μCi ^{3}H-Leucin	346oo	o
Kompletter Ansatz + 1o μCi ^{3}H-Leucin + 2ooγ Puromycin	328o	91 %

Nuclei wurden während 6o Min. bei 37^{o} C in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit von Puromycin im Incubationsansatz incubiert. Das Incubationsvolumen betrug o,5 ml. Die Proben enthielten: o,125 ml Kernsuspension, durchschnittlich o,o63 ml der 1o1555 xg-Gehirnhyaloplasma-Fraktion (o,35 $\pm$ o,o1 mg Protein), 5 bzw. 1o μCi ^{3}H-Leucin (spez. Aktivität 46,9 Ci/mMol) sowie 15o bzw. 2ooγ Puromycin. Weitere Einzelheiten der Incubation sowie Radioaktivitätsmessung siehe Abschnitt "Material und Methoden".

5. Autoradiographische Befunde.

Lichtmikroskopische Autoradiographie wurde benutzt, um die Lokalisation der Radioaktivität zu bestimmen.
Die Autoradiogramme der Abb. 14, 15 und 16 offenbaren die Markierung, verteilt innerhalb der Nuclei, die jeweils mit 5 µCi, 1o µCi oder 2o µCi/o,5 ml Ansatz, ^{3}H-Leucin (spez. Akt. 46,9 CimMol) während 6o Min. bei 37^{o} C incubiert wurden. Keine nicht-nuclearen Strukturen, mit Radioaktivität beladen, wurden lichtmikroskopisch ausgemacht.

Die Incorporationsrate in dpm/mg Protein zeigt die Tab. 8. Unsere Befunde erlauben den Schluß, daß sich die Radioaktivität, die im Szintillationszähler erfaßt wird, aus der Radioaktivität, die mit den Kernen assoziiert ist, herleitet.

Abb. 17 und 18 präsentieren Autoradiogramme nach Incubation von Gehirnnuclei mit jeweils 5 und 1o µCi ^{3}H-Leucin (spez. Akt. 46,9 Ci/mMol) /o,5 ml Ansatz, während 6o Min. und bei 37^{o} C, bei Anwesenheit von entsprechend 15o oder 2oo$_{\gamma}$ Puromycin im Incubationsmedium.
Die Reduktion der Markierung ist evident; eine Tatsache, die in unserer bereits schon beschriebenen über 9o %igen Hemmung der in vitro Proteinsynthese ihr biochemisches Correlat findet.

Tab. 9 Incorporation in vitro von ^{3}H-Leucin in Kernsuspensionen vom Rattengehirn.

Radioaktivitätsmenge	dpm/mg Protein nach 6o Min. Incubation
5 µCi	228oo
1o µCi	443oo
2o µCi	857oo

Gehirnzellnuclei, mit hypertonischer Saccharose und Triton-X-1oo gereinigt, wurden während 6o Min. bei 37° C und mit jeweils 5, 1o oder 2o µCi ^{3}H-Leucin (spez.Akt. 46,9 Ci/mMol) incubiert.
Das Incubationsvolumen betrug o,5 ml.
Einzelheiten der Incubation sowie der Radioaktivitätsmessung s. im Abschnitt "Material und Methoden".

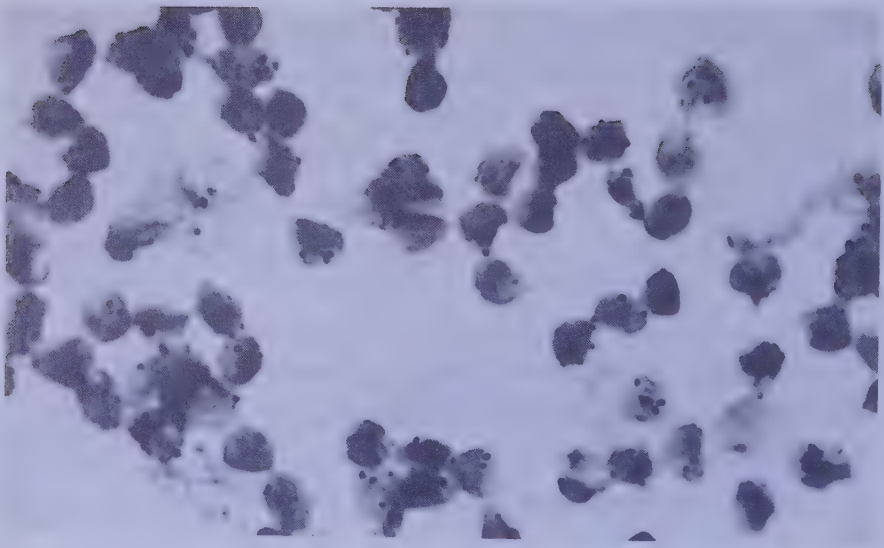


Abb. 14 Lichtmikroskopisches Emulsionsautoradiogramm von in vitro incubierten Gehirnzellnuclei mit 5 μCi/o,5 ml Incubationsmedium ^{3}H-Leucin (spez.Aktivität 46,9 Ci/mMol) für 6o Min. und bei 37^{o} C.

Einzelheiten der Incubation sowie autoradiographische Technik wie im Abschnitt "Material und Methoden" dargestellt.

Fixierung: mit 3 proz. Glutaraldehyd-Lösung

Vergrößerung: 1 : 25oo

Expositionszeit: 2 Wochen

Prof. H.-J. MERKER Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin

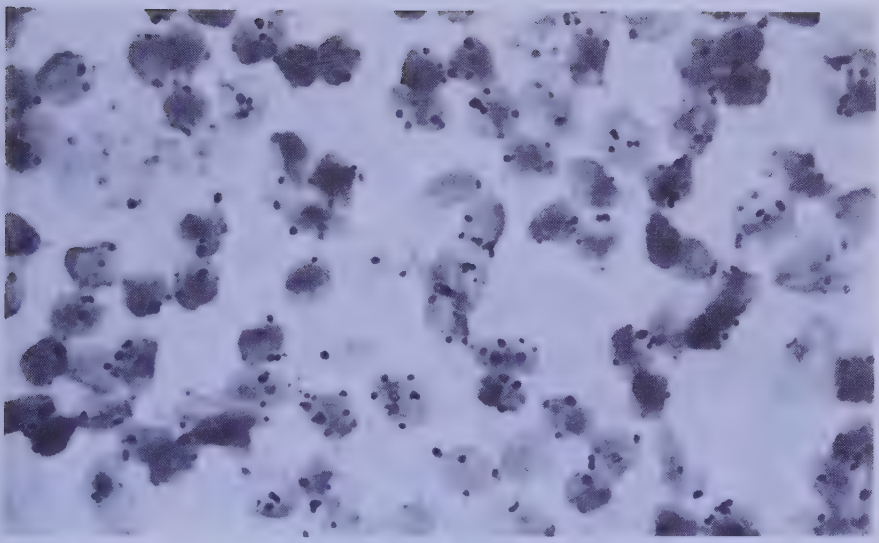


Abb. 15 Lichtmikroskopisches Emulsionsautoradiogramm von in vitro incubierten Gehirnzellnuclei mit 1o μCi/o,5 ml Incubationsmedium ^{3}H-Leucin (spez.Aktivität 46,9 Ci/mMol) für 6o Min. und bei 37 ^{o} C.
Einzelheiten der Incubation sowie autoradiographische Technik wie im Abschnitt "Material und Methoden" ausführlich beschrieben.
Fixierung: mit 3 proz. Glutaraldehyd-Lösung
Vergrößerung: 1 : 25oo
Expositionszeit: 2 Wochen
Prof. H.-J. MERKER Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin

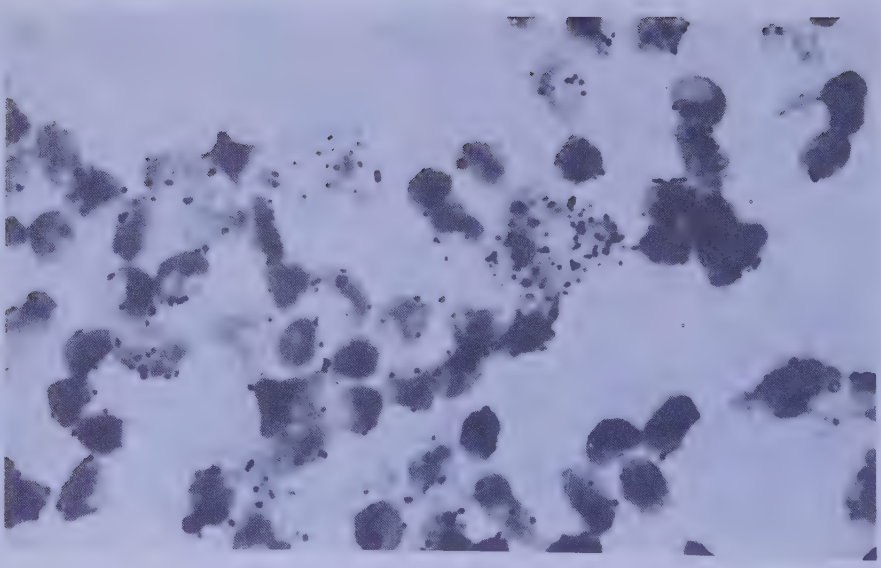


Abb. 16 Lichtmikroskopisches Emulsionsautoradiogramm von in vitro incubierten Gehirnzellnuclei mit 2o µCi/o,5 ml Incubationsmedium ^{3}H-Leucin (spez.Aktivität 46,9 Ci/mMol) für 6o Min. und bei 37° C.

Einzelheiten der Incubation sowie autoradiographische Technik wie im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

Fixierung: mit 3 proz. Glutaraldehyd-Lösung

Vergrößerung: 1 : 25oo

Expositionszeit: 2 Wochen

Prof. H.-J. MERKER Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin

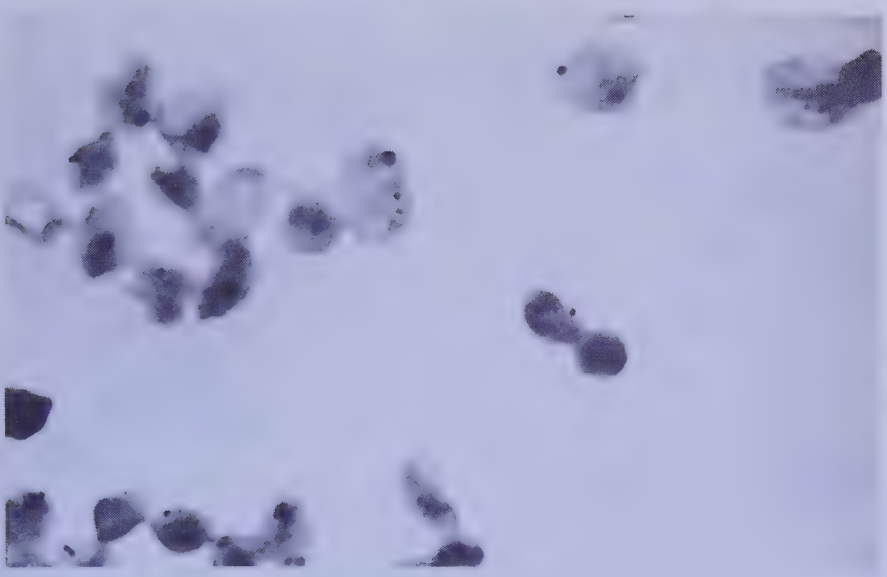


Abb. 17 Lichtmikroskopisches Emulsionsautoradiogramm von Gehirnzellnuclei der erwachsenen Ratte nach Incubation während 6o Min. bei 37°C mit ^{3}H-Leucin (spez.Akt. 46,9 Ci/mMol) 5 µCi und bei Anwesenheit von 15oγ Puromycin in o,5 ml Incubationsmedium.

Einzelheiten der Incubation sowie autoradiographische Technik s. Abschnitt "Material und Methoden".

Fixierung: mit 3 proz. Glutaraldehyd-Lösung

Vergrößerung: 1 : 25oo

Expositionszeit: 2 Wochen

Prof. H.-J. MERKER Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin

Abb. 18 Lichtmikroskopisches Emulsionsautoradiogramm von Gehirnzellnuclei nach Incubation während 6o Min. bei 37° C mit 1o μCi ^{3}H-Leucin (spez. Aktivität 46,9 Ci/mMol) bei Anwesenheit von 2ooγ Puromycin in o,5 ml Incubationsmedium. Einzelheiten der Incubation sowie autoradiographische Technik s. Abschnitt "Material und Methoden".

Fixierung: mit 3 proz. Glutaraldehyd-Lösung

Vergrößerung: 1 : 25oo

Expositionszeit: 2 Wochen

Prof. H.-J. MERKER Forschungsabteilung für Elektronenmikroskopie der Freien Universität Berlin

III. DISKUSSION

Es ist allgemein akzeptiert, daß die Polysomen die eigentlichen Proteinsynthese-aktiven Orte und Strukturen darstellen, in denen die gerichtete Verknüpfung der Aminosäuren zur Peptidkette erfolgt.

Auf die Möglichkeit der Synthese von Proteinen auch in Zellkernen wurde bereits 1950 erstmalig hingewiesen (CASPERSSON 1950); dieser Vorgang blieb aber trotz mehrerer Veröffentlichungen darüber Gegenstand zahlreicher Kontroversen. Eine exzellente Übersicht dieser Diskussion wird bei GOLDSTEIN 1970 wiedergegeben. Quantitativ ist wahrscheinlich der Prozeß der nuclearen Proteinsynthese relativ gering, qualitativ kann er aber eine große Bedeutung für die Regulation der Genaktivität in eukaryotischen Organismen haben.

Es wurde gezeigt, daß hochgereinigte nucleare Präparationen die für die Proteinsynthese notwendigen Bestandteile enthalten: aktivierende Enzyme (HOPKINS 1959), transfer - RNA (HOPKINS 1959), messenger - RNA (DIGIROLAMO, HENSHAW, HIATT 1964; BONDY and ROBERTS 1967); Ribosomen (FRENSTER, ALLFREY, MIRSKY 1960; WILSON and HOAGLAND 1965).

Der Einbau von Aminosäuren in Kerne von Thymus (ALLFREY, MIRSKY and OSAWA 1957; ALLFREY, HOPKINS, FRENSTER, MIRSKY 1960; ALLFREY, MEUDT, HOPKINS, MIRSKY 1961; ALLFREY, LITTAU and MIRSKY 1964; REID and COLE 1964; PATEL and WANG 1965; REID, STELLWAGEN, COLE 1968), Leber

(LOGAN, FICQ, ERRERA 1959; RENDI 196o; REES and ROWLAND 1961; McCARTHY, PARSONS, CARTER and LASZLO 1966; WANG and PATEL 1967; UETE 1967; ONO and TERAYAMA 1968; DEISSEROTH 1969; WESER and KOOLMAN 1969) und Milz (TSUZUKI and NAORA 1968; TSUZUKI 1969) war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, und die dabei erhobenen Befunde geben hinreichend Hinweise auf eine Proteinsynthese in diesen nuclearen Präparationen.

Nuclei, isoliert von Pflanzen (BIRNSTIEL, HYDE 1963), Insekten (HELMSING 197o), FIschen (TREVITHICK 1969), Amphibien (GRANGER 1969) und Vögeln (HAMMEL and BESSMAN 1965) katalysieren ebenfalls die Incorporation radioaktiver Aminosäuren in Proteine.
Dieses in der Natur offensichtlich weitverbreitete Phänomen deutet auf eine universelle Eigenschaft nuclearer Systeme hin, Proteine zu synthetisieren, deren Ausmaß und Spektrum je nach Kerntyp variiert und deren Relevanz für die nucleare Funktion es noch zu erforschen gilt.

Während die Proteinsynthese im Säugetiergehirn extensiv studiert wurde (WAELSCH and LAJTHA 1961; NEUBERGER and RICHARDS 1964; LAJTHA 1964; LAJTHA 1965; JOHNSON and LUTTGES 1966), gibt es in der Literatur nur geringe und zudem nicht widerspruchsfreie Information über die proteinsynthetische Aktivität nuclearer Präparationen aus dem Zentralnervensystem (ZNS) (INAMURA, KATO, KUROKAWA 1968; BURDMAN and JOURNEY 1969; LØVTRUP-REIN 197o; FLEISCHER-LAMBROPOULOS, REINSCH 1971).

Dies dürfte zum Teil darauf zurückzuführen sein, daß die angewandten Techniken bei der Kernisolierung aus anderen, vorwiegend homogenen Geweben nur partiell erfolgreich waren bei der Isolierung von Kernen aus dem ZNS, bestehend aus heterogenen Zellpopulationen, die gewöhnlich mit Fragmenten aus Dendriten, Axonen und Myelin kontaminiert sind. In diesem Zusammenhang sei hier auch auf die extreme Fragilität neuronaler Nuclei hingewiesen (LØVTRUP-REIN, McEWEN 1966).

Isolierung von Nuclei in nichtwässrigen Medien (BEHRENS 1932) ergibt gewiß ziemlich reine Präparationen (SIEBERT, HAMPHREY, THEMANN, KERSTEN 1965), ist jedoch mit dem Nachteil der Denaturierung von Proteinen und somit der Inaktivierung nuclearer Enzyme behaftet. (McEWEN and ZIGMOND 1972).
Solche nuclearen Präparationen, im Gemisch organischer Lösungsmittel gewonnen, erweisen sich verständlicherweise als weitgehend inaktiv beim Einbau von Aminosäuren in die Proteine (ALLFREY, STERN, MIRSKY, SAETREN 1952; OSAWA, ALLFREY, MIRSKY 1957).
Techniken der Nucleiisolierung durch Aufarbeitung von Gewebshomogenaten in wässrigen Medien ist daher für unsere Fragestellung der Vorzug zu geben.

Isolierte Nuclei ,bestimmt für metabolische Untersuchungen, müssen frei von adhaerentem Cytoplasma, Erythrocyten und Zelltrümmern sein, ferner ihre morphologische sowie

biochemische Integrität bewahrt haben und schließlich repräsentativ für ein heterogenes Organ sein, wie es das Gehirn ist. (RAPPOPORT, MAXCY, DAGINAWALA 1969).
Die Nichtbeachtung solcher allgemeiner Kriterien dürfte mindestens teilweise der Grund für vorhandene Diskrepanzen in den in der Literatur niedergelegten Befunden über die metabolischen Aktivitäten isolierter Nuclei sein.

Unsere Ergebnisse demonstrieren offensichtlich, daß wir uns an die Anwendung existierender Reinheitskriterien strikt gehalten haben.
Die morphologische Untersuchung unserer Kernpräparationen im Licht- wie auch Elektronenmikroskop schließt cytoplasmatische Verunreinigungen aus.
Die analytische Charakterisierung durch Bestimmung der nuclearen DNA und RNA bestätigte das Ergebnis der optischen Untersuchungsverfahren. Wir haben eine RNA/DNA Relation von o,o8o gemessen, ein Zahlenwert, der mit Messungen von FLEISCHER-LAMBROPOULOS und REINSCH 1971 übereinstimmt.
Andere Autoren (BURDMAN, JOURNEY 1969; LØVTRUP-REIN 197o) geben einen weitaus höheren RNA/DNA Quotienten an; ein Befund, der mikrosomale Verunreinigung impliziert bzw. cytoplasmatische Proteinsynthese nicht überzeugend ausschließt.

Der hohe Reinheitsgrad unserer Kernpräparationen beruht zweifellos auf der Exposition der "rohen Zellkernfraktion" im nicht-ionischen Detergens Triton-X-1oo und auf der Behandlung mit hypertonischer Saccharose.

Triton-X-1oo (iso-octylphenoxypolyethoxyethanol), welches Auflösung cytoplasmatischer Membranen, Mitochondien, Mikrosomen und Erythrocyten bewirkt, ermöglicht nahezu völlige Eliminierung der äußeren Schicht der nuclearen Membran, ohne dabei die morphologische und biochemische Integrität isolierter Nuclei hinsichtlich ihrer proteinsynthetischen Aktivität zu beeinträchtigen.
Es ist offensichtlich, daß unsere mit Triton-X-1oo behandelten Nuclei gegenüber Präparationen anderer Untersucher ohne Detergensanwendung (SPORN, WANKO, DINGMAN 1962; BONDY and ROBERTS 1964; BONDY and WAELSCH 1965; KATO and KUROKAWA 1967) überlegen sind, da der äußere Anteil der nuclearen Doppelmembran als Fortsetzung des endoplasmatischen Reticulums (WATSON 1955) ribosomenähnliche Partikel trägt, welche die Bedingungen beeinflussen können, wenn die Proteinsynthese in isolierten Nuclei untersucht werden soll.

Die etwaige von BURDMAN und JOURNEY 1969 und LØVTRUP-REIN 197o mitgeteilte inkomplette bzw. komplette Hemmung der proteinsynthetischen Aktivität nach Exposition nuclearer Präparationen in Triton-X-1oo - Befunde allerdings, die im Gegensatz zu unseren Ergebnissen und den Mitteilungen anderer Autoren (GALLWITZ und MUELLER 1969; FLEISCHER-LAMBROPOULOS, REINSCH 1971) stehen, - beruht zweifellos auf einer zu langen Einwirkungszeit des Detergens, wobei Extraktion nuclearer Proteine und RNA eintritt.

Reinigung nuclearer Präparationen mit hochmolaren Saccharose-Lösungen ist indiziert, um Myelinfragmente und andere Zell-

trümmer zu entfernen, zumal Myelin gegenüber Triton-X-1oo resistent ist.
Hemmung der proteinsynthetischen Aktivität isolierter Nuclei nach Behandlung mit hypertoner Saccharose, wie bei BURDMAN und JOURNEY 1969 angegeben, konnten wir für Gehirn- wie auch Leberzellnuclei in Übereinstimmung mit RENDI 196o, INAMURA, KATO and KUROKAWA 1968, ONO and TERAYAMA 1968, LØVTRUP-REIN 197o, FLEISCHER-LAMBROPOULOS, REINSCH 1971 nicht beobachten. Allerdings ist es notwendig, die "reine Zellkernfraktion" ausgiebig mit niedermolaren Saccharose-Lösungen zu waschen, um eine die in vitro Proteinsynthese beeinträchtigende Hypertonie des Incubationsmédiums zu vermeiden - ein Schritt indessen, den wir bei BURDMAN und JOURNEY 1969 vermissen.

Bei unseren in vivo Untersuchungen des Proteinmetabolismus wurden erwachsene Ratten mit radioaktiven Aminosäuren behandelt und die Incorporation dieses Materials in die nuclearen Proteine nach einer festgesetzten Zeit gemessen.

Die experimentelle Zeit muß, verglichen mit der Umsatzzeit der betroffenen Proteine, kurz gehalten werden, anderenfalls würde der Proteinabbau einen zu berücksichtigenden Faktor darstellen.
Im cerebralen Cortex sind Halbwertzeiten für Proteine von 5 bis 15 Tagen angegeben worden (WAELSCH and LAJTHA 1961). Die längste experimentelle Zeit, die in dieser Studie in Anspruch genommen wurde, betrug 5 Stunden, und meistens wa-

ren es 3o - 6o Min., was als genügend kurz angesehen wird.

Eine wichtige einleitende Frage ist die der Applikation des radioaktiven Leucins oder anderer Aminosäuren. Wir haben als wichtig erachtet, den Grad des Stresses möglichst gering zu halten, da Stress keine standardisierten experimentellen Bedingungen garantiert,und auf den Gebrauch von Narcotica zu verzichten, weil diese die Proteinsynthese verändern. (GAITONDE & RICHTER 1956).

Es ist wichtig, die Zeitabhängigkeit der Incorporation nach einmaliger intravenöser Injektion von Leucin zu untersuchen, um die optimale Zeit für das Experiment zu wählen. Wir haben in Übereinstimmung mit BURDMAN 197o gefunden, daß die proteingebundene Radioaktivität 6o Min. nach der Applikation von ^{3}H-Leucin den höchsten Wert aufweist, während bei HAMBERGER, BLOMSTRAND and YANAGHIHARA 1971 für Kaninchengehirn die Spitze bei 3o und 18o Min. liegt.

Einen weiteren wichtigen Aspekt bei in vivo Untersuchungen des Proteinstoffwechsels im Gehirn stellen die Permeabilitätsverhältnisse der Blut-Gehirn-Schranke dar.
Das Gehirn bezieht die Proteinbausteine entweder durch Synthese aus anderen Aminosäuren oder Glucose in situ oder vom Blutaminosäurepool.
Aufnahme von Aminosäuren vom Blut erfordert jedoch die Penetration durch die Blut-Gehirn-Schranke, welche für die meisten Moleküle von der Größe der Aminosäuren impermeabel ist. Eine Korrelation zwischen Aufnahme und molekularer

Struktur besteht nicht. (OLDENDORF 1971).
Die beobachtete selektive, freie Passage mancher Aminosäuren vom Blut ins Gehirn ist zudem auf spezielle aktive Transportmechanismen zurückzuführen. (LAJTHA 1962).

Unsere Messungen der Incorporation verschiedener Aminosäuren in die nuclearen Proteine unter in vivo Bedingungen zeigen, daß sich nur nach Injektion essentieller Aminosäuren ein signifikanter Einbau ereignet, während die nicht essentiellen Aminosäuren nur unerhebliche Einbauraten aufweisen.
Offenbar ist die Blut-Gehirn-Schranke für Aminosäuren, die im Gehirn selbst synthetisiert werden können, nur zu einem geringeren Grad permeabel als für essentielle Aminosäuren.
In diese Richtung weisen auch die Ergebnisse von OLDENDORF 1971.
Der Glutamin- und Asparaginsäuregehalt der cerebralen Proteine entstammt demnach nicht dem Blutaminosäurepool sondern anderen Quellen, nämlich der Glucose, wie es auch den Untersuchungen von YOSHINO und ELLIOTT 197o zu entnehmen ist, denen zufolge nach intravenöser ^{14}C-Glucose-Gabe Asparagin- und Glutaminsäure schnell im Gehirn erscheinen.

Die hohe Incorporationsrate des Tyrosins, die eine entsprechende Penetrationsfähigkeit durch die Blut-Gehirn-Schranke voraussetzt, könnte durch das Fehlen der Phenylalaninhydroxylase im Gehirn erklärt werden (GUROFF and ABRAMOWITZ 1967) - ein Grund, der diese Aminosäure nur für das Gehirn essentiell gestaltet, obwohl sie im extraneuralen Gewebe durch Hydroxylierung von Phenylalanin mittels einer Leberhydroxylase ent-

steht und somit als nicht essentiell betrachtet werden kann. (ROSE, OESTERLING and WOMACK 1948).

Von den getesteten Aminosäuren in vivo wie auch in vitro wies Leucin die höchste Einbaurate in den Kernproteinen auf. Schon aus diesem Grunde fand in unseren Studien ^{3}H-Leucin Anwendung als radioaktiver Praekursor und empfiehlt sich generell für Proteinstoffwechseluntersuchungen dieser Art, zumal Leucin eine der geläufigsten Aminosäuren ist, die in den nuclearen Proteinen vorkommt. (BUSCH 1965).

Der Metabolismus des Gehirns auf cellulärer oder subcellulärer Ebene repräsentiert naturgemäß Aktivitäten recht heterogener Elemente, die im Laufe der Phylogenie einen bemerkenswerten Grad von struktureller und funktioneller Spezialisierung erfahren haben, welche in keinem anderen lebenden System anzutreffen ist.
Neuronen sind generell von ihrer systemischen Umgebung durch verschiedene Barrieresysteme isoliert, stehen jedoch zur Deckung ihrer Stoffwechselbedürfnisse in einem intimen, einer Symbiose vergleichbaren, Verhältnis zu den benachbarten, nicht neuronalen Elementen.

Mit der Absicht, einige Aspekte der Neuron - Glia - Wechselwirkungen sowie den relativen metabolischen Beitrag beider Zellkerntypen auf den gesamten Haushalt des Gehirns zu untersuchen, haben wir unter Zuhilfenahme der Dichte-Gradienten-Ultra-Zentrifugation nicht nur Reinigung nuclearer Präparationen vorgenommen, sondern auch Trennung neuronaler von glialen Nuclei angestrebt.

Dabei erwiesen sich Versuche mit kontinuierlichem Saccharose-Gradienten als nicht erfolgreich, weil unscharfe Schichten gebildet werden und sich von daher die Gewinnung homogener nuclearer Fraktionen schwierig gestaltet. Ähnliche Beobachtungen machten auch LOVTRUP und McEWEN 1966. Nur die diskontinuierliche Gradienten-Ultra-Zentrifugation ergab scharf umrissene Schichten und ermöglichte exakte Trennung intakter neuronaler von glialen Nuclei in quantitativ ausreichender Menge für metabolische Untersuchungen dieser Art.

Wie auf Grund morphologischer Unterschiede zu erwarten war, fanden wir in Übereinstimmung mit Untersuchungen in vivo von BURDMAN 197o nach intravenöser Applikation von ^{3}H-Leucin eine höhere Incorporationsrate bei den neuronalen als bei den glialen nuclearen Proteinen.
HAMBERGER, BLOMSTRAND, LEHNINGER 197o berichteten auch über eine größere proteinsynthetische Kapazität neuronaler gegenüber glialen Mitochondrien.
Höhere Raten der Synthese für NAD und RNA in neuronalen Nuclei wurden ebenfalls angegeben. (KUROKAWA, KATO and INAMURA 1966; KATO 1968; FLANGAS and BOWMAN 197o; LØVTRUP-REIN 197o; LØVTRUP-ReIN and GRAHN 197o).

Die hohen Syntheseraten von neuronaler RNA und Proteinen kann mit der Bildung von Makromolekülen in Neuronen, und auf diese Weise direkt mit den speziellen Funktionen des Gehirns, in Beziehung gebracht werden.

Da jedoch die Nervenzellen schon bald nach der Geburt die Eigenschaft, ihre Erbsubstanz zu replizieren, verlieren, reflektiert die hohe proteinsynthetische Kapazität neuronaler Nuclei die physiologische Aktivität der Zelle und nicht die Erfordernisse der Mitose.
Die beobachtete Ähnlichkeit zwischen Glia und Gesamthirnfraktion bei der Verteilung der Radioaktivität in den nuclearen Proteinen dürfte offensichtlich auf dem relativ größeren Anteil des Gehirns an Neuroglia als an Nervenzellen beruhen. In diese Richtung weisen auch Berechnungen von NURNBERGER 1958.

Für das Ausmaß der radioaktiven Markierung von Proteinen ist die spezifische Aktivität des Praecursors im intracellulären Aminosäurepool von entscheidender Bedeutung. Dieser Parameter wird unter anderem vom endogenen Aminosäurespiegel, Transportmechanismen und Modus der Applikation des radioaktiven Praecursors beeinflußt. (HAMBERGER, BLOMSTRAND and YANAGIHARA 1971).
Der Aminosäurepool wurde größer in Neuronen als in Gliazellen gefunden. (RoSE 1967; 1968).
HAMBERGER et al. 1971 berichteten indessen, daß isolierte Gliazellen zu einem größeren Ausmaß als Neuronen freie Aminosäuren akkumulieren, was möglicherweise eine niedrigere spezifische Aktivität des Praecursors in Nervenzellen zur Folge hat.
Die dennoch gemessene höhere Incorporationsrate von ^{3}H-Leucin in neuronalen als in glialen nuclearen Proteinen läßt eine viel größere effektive proteinsynthetische Kapazität der Neuronen annehmen.

In Übereinstimmung mit uns berichteten INAMURA, KATO, KUROKAWA 1968, HAMBERGER, BLOMSTRAND, YANAGIHARA 1971, FLEISCHER-LAMBROPOULOS, REINSCH 1971 über höhere in vitro Einbauraten radioaktiver Aminosäuren in neuronalen als in glialen Nuclei.
Bei FLEISCHER und REINSCH 1971 zeigte aber die gesamte Zellkernfraktion eine höhere Incorporationsaktivität als die neuronale nucleare Fraktion; ein Befund, der sich jedoch mit den Gegebenheiten nicht verträgt.

Bemerkenswerterweise ist die Korrespondenz unserer in vivo gewonnenen Resultate mit einigen in vitro Untersuchungen anderer Autoren nicht immer eindeutig.
So fanden LØVTRUP-REIN 197o, daß die ^{14}C-Leucin-Incorporation in neuronale Nuclei niedriger als in Astroglia- und höher als in Mikroglia- und Oligodendroglianuclei war, während bei BURDMAN und JOURNEY 1969 Neuronenkerne weniger aktiv als Oligodendroglia- und Mikroglia- und aktiver als Astroglianuclei waren.

Die Gründe für solche in der Literatur niedergelegten, zum Teil inkongruenten Darstellungen, sind entsprechend den Versuchsbedingungen und der Natur des Problems multifaktorieller Genese.
Wir weisen auf eine eventuelle Inhomogenität nuclearer Fraktionen als Attribut methodischer Unzulänglichkeiten hin, und ziehen eine mögliche Cross-Kontamination zur Erhellung ambivalenter Aussagen heran.

Bei den in vitro Versuchsanordnungen handelt es sich indessen immer um mehr oder weniger vereinfachte, im Vergleich zu der Situation am lebenden Tier modifizierte Aminosäureincorporie-

rende-Systeme, zumal die Nuclei aus ihrem Aktionsort, ihren kommunikativen Beziehungen und den vielfältigen regulativen Einflüssen entzogen werden und zudem der radioaktive Praekursor, unter Umgehung von multiplen Barrieresystemen, direkt im Incubationsmedium appliziert wird.
Wenn auch hinsichtlich der identischen Reproduktion der in vivo Mechanismen in den in vitro ablaufenden Reaktionen keinerlei Zweifel bestehen, sind die kontrollierenden Faktoren in vitro unterschiedlich oder fehlen gar.
Dies bedeutet ein ständiges Dilemma beim Interpretieren der in vitro Resultate über Neuron-Glia'Interaktionen und Aktivitäten, obwohl andererseits diese Untersuchungsart eine leistungsfähige Methode darstellt, die aus dem Komplexitätsgrad des Gehirns sich ergebenden Schwierigkeiten zu überwinden.

Von besonderer Wichtigkeit sind in vitro Studien, wenn dargelegt werden soll, daß isolierte Nuclei im zellfreien Milieu zur Aminosäureincorporation fähig sind, zumal die in vivo Untersuchungen einen selektiven Beitrag der an der äußeren nuclearen Membran adhaerenten Ribosomen nicht auszuschließen vermögen und naturgemäß keinen Einblick in Einzelheiten der Proteinsynthese gewähren.
In vitro Testsysteme ermöglichen sowohl kinetische Untersuchungen als auch hohe Markierungsraten, die eine genauere Analyse der gebildeten Proteine erlauben.

Isolierte Nuclei nach Incubation mit ^{3}H-Leucin ergeben qualitativ ein sehr ähnliches Muster der Radioaktivitätsverteilung

wie Nuclei, die nach intravenöser Injektion von ^{3}H-Leucin von der Ratte erhalten wurden.
Zahlreiche Autoradiogramme dieser Vorgänge stellen die Markierung, innerhalb der Nuclei lokalisiert, dar.
In unserer in vitro Versuchsanordnung fanden wir einen unterschiedlichen Einbau der jeweilig getesteten Aminosäure in die nuclearen Proteine und eine Zunahme der Incorporation von ^{3}H-Leucin bei ansteigenden Radioaktivitätsmengen im Incubationsmedium.
Bei optimalen Incubationsbedingungen deuten diese Ergebnisse auf heterogene metabolische Pools in cellulärer und subcellulärer Ebene des Gehirns hin.

Die beobachtete Abnahme der Rate der Incorporation von ^{3}H-Leucin bereits nach 15 min. Incubation weist auf einen Abfall der aktuellen Konzentration, möglicherweise durch Übertritt einiger bei der Aminosäure-Einbaureaktion beteiligter Faktoren (z.B. Aminosäuren aus dem nuclearen Pool, Enzyme oder andere Bestandteile) in das Incubationsmedium, hin. Diese Annahme deckt sich offensichtlich mit Befunden, denen zufolge präincubierte Nuclei niedrigere Incorporationsraten aufweisen als Nuclei ohne jegliche Präincubation. (Dr. FLEISCHER, unveröffentlichte Mitteilung).

Vergleichende Untersuchungen mit nuclearen Präparationen aus Rattenleber zeigten in Übereinstimmung mit Ergebnissen von LØVTRUP-REIN 197o und FLEISCHER-LAMBROPOULOS, REINSCH 1971, daß Gehirnzellkerne eine größere Incorporationsaktivität aufweisen als Leberzellnuclei; dieser markante Unter-

schied ließ sich allerdings unter in vivo Bedingungen nach intravenöser Applikation radioaktiver Aminosäuren nicht deutlich nachweisen, weil die in vivo Markierung cerebraler Proteine offenbar durch die Blut-Gehirn-Schranke kontrolliert wird, welche die Aufnahme der verschiedenen Metaboliten im Gehirn beeinflußt.

In einer Reihe von Experimenten wurde auch die extranucleäre, cytoplasmatische, ribosomale Proteinsynthese unter in vivo und in vitro Bedingungen untersucht und quantitative Vergleiche mit nuclearen Präparationen gezogen.

Nach intravenöser Applikation des radioaktiven Praekursors lag die Incorporationsrate 2,14 mal höher in den ribosomalen als in den nuclearen Fraktionen des Rattengehirns. Diese Relation kann jedoch nicht als real angesehen werden, da Aminosäurepool-Unterschiede in beiden Zellkompartimenten und Umsatzgeschwindigkeiten der gebildeten Proteine nicht berücksichtigt werden können.
Hinzu tritt eine Freisetzung und Wanderung ribosomaler Proteine vom Ort der Synthese in andere subcelluläre Regionen ein, z.B. von den Ribosomen in die Kerne oder von der pericaryalen Region zum distalen Axon.

Quantitative Vergleiche in vitro ergaben eine um 9,5 mal höhere Einbaurate in den ribosomalen als in den nuclearen Proteinen.
Hierbei können Fragen der Poolgröße und Aufnahme des radio-

aktiven Praekursors am Ort der Proteinsynthese leichter angegangen oder als Fehlerquellen außer Acht gelassen werden als bei den korrespondierenden in vivo Experimenten.
Während sich bei den in vitro Versuchen die spezifische Aktivität der eingebauten Aminosäure errechnen läßt, ist es jedoch unter den gewählten in vivo Bedingungen unmöglich, die spezifische Aktivität der Aminosäure, welche aktuell incorporiert wird, zu bestimmen.

Es bleibt nun im Folgenden zu erörtern, ob die gemessene Incorporation radioaktiver Aminosäuren tatsächlich eine Proteinsynthese repräsentiert und nicht etwa eine simple terminale Addition der zugesetzten Radioaktivität. Darstellung eines Proteins, welches bekanntermaßen an einer RNA-Matrize in Gehirnzellkernen synthetisiert und in vitro markiert wird, könnte hierbei Klarheit verschaffen; ein solches Protein ist bisher jedoch noch nicht nachgewiesen worden.
Auf einfachere Weise gelingt es aber durch Anwendung bekannter Inhibitoren der Proteinsynthese zu zeigen, daß Aminosäureincorporation der Polypeptidsynthese äquivalent ist.

In unseren Experimenten fanden wir sowohl in vivo nach intraventriculärer Applikation von Puromycin, wie auch in vitro nach Zugabe dieses Antibioticums im Incubationsmedium, eine signifikante Hemmung des Aminosäure-Einbaues, welche impliziert, daß Aminoacyl transfer-RNA und Ribosomen in den Prozeß der nuclearen Proteinsynthese verwickelt sind.

Über Hemmbarkeit der Aminosäure-Einbaureaktion durch Cycloheximid, Ribonuclease und Desoxyribonuclease, sowie Unempfindlichkeit des nuclearen synthetisierenden Systems gegenüber Chloramphenicol wurde schon berichtet. (FLEISCHER-LAMBROPOULOS, REINSCH 1971).

Kinetik der Incorporation, Konstanz der proteingebundenen Radioaktivität unter gleichen Incubationsbedingungen, partielle Hemmung durch Cycloheximid und Unwirksamkeit von Chloramphenicol schließen einen signifikanten bakteriellen Beitrag zu dem beobachteten Aminosäure-Einbau aus.

Die Erfordernisse unseres Aminosäure-incorporierenden Systems für Mg-Ionen, einer 1o5ooo xg-Hyaloplasma-Fraktion, eines ATP-regenerierenden Systems sowie ausgeprägte Empfindlichkeit gegenüber RNase und Antibiotica zeigen, daß die Proteinsynthese in Gehirnzellnuclei mit ähnlichen, wenn nicht identischen Mechanismen wie in den mikrosomalen Systemen des Cytoplasmas abläuft.
Überdies wurden bisher elektronenmikroskopisch nucleare Ribosomen in Thymocyten, (FRENSTER, ALLFREY, MIRSKY 196o) Leberzellen (WANG 1961) und HeLa-Zellen (WINCKELMANS, HILL, ERRERA 1964) nachgewiesen.
Isolierung solcher Ribonucleoprotein-Partikel aus nuclearen Präparationen, die fähig sind, im zellfreien Milieu Aminosäuren in Proteine einzubauen, unterstützen das allgemeine Konzept einer Ribosomen-abhängigen Proteinsynthese im Nucleus, besonders dann, wenn vorher die cytoplasmatischen Ribosomen aus dem äußeren Blatt der nuclearen Membran entfernt wurden. (McCARTHY, PARSONS, CARTER and LASZLO 1966).

Nucleare Ribosomen können an der Bildung von Histonen beteiligt sein. (HNILICA 1967).
Histone liegen als DNA-Protein-Komplexe vor und regulieren möglicherweise die Synthese von messenger-RNA, (BONNER, DAHMUS, FAMBROUGH, HUANG, MARUSHIGE, TUANG 1968) indem sie die Transkription der als Nucleohistonkomplexe vorliegenden DNA-Bereiche verhindern.

Aminosäure-Incorporation findet auch in Rattenleber-Chromatin und Chromatinfraktionen, (SEKERIS, SCHMID, GALLWITZ und LUKACS 1966; 1966) in nuclearen Residua nach Extraktion der Ribosomen (PATEL and WANG 1965) und in Nucleoli (MAGGIO 1966; VOULGARIS, FLEISCHER, REINSCH unveröffentlichtes Ergebnis 1972) statt.

Das diffuse Muster der Radioaktivitätsverteilung und die proteinsynthetische Kapazität differenter subnuclearer Partikel deuten auf mehrere Orte der Proteinsynthese innerhalb des Nucleus hin.
Wegen der Heterogenität der nuclearen Proteine, der relativ langen Incorporationszeit bei unseren autoradiographischen Untersuchungen, des Fehlens ausreichender Angaben über den Reinheitsgrad der getesteten subnuclearen Elemente und der Möglichkeit eines schnellen Austausches von Proteinen sind weitere Untersuchungen angezeigt, um diese Hypothese zu bestätigen oder zu modifizieren.

Veränderungen des RNA- und Proteinmetabolismus des ZNS

treten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen auf, so z.B. bei physiologischer Stimulierung (RAPPOPORT and DAGINAWALA 1968), bei Lernprozessen (HYDÉN and EGYHAZI 1964) und hormonell bedingter Induktion der RNA-Synthese. (s. Übersicht KARLSON und SEKERIS 1973).

Die strukturellen Veränderungen bei der postnatalen Reifung des ZNS finden während dieser Periode ihr biochemisches Korrelat in höheren metabolischen Raten.
Die Syntheseraten cerebraler Proteine und RNA sind höher im unreifen Gehirn als im adulten Nervengewebe. (MILLER 1969; ROBERTS, ZOMZELY and BONDY 197o).
RNA-Polymerase und messenger-RNA sind aktiver im Gehirn unreifer als adulter Tiere. (BARONDES 1964; YAMAGAMI, FRITZ and RAPPOPORT 1966).
Die einschlägigen Untersuchungen stimmen darin überein, daß im Säugetiergehirn die Raten der Protein- und Nucleinsäuresynthese während der Entwicklung abnehmen. (LAHIRI and LAJTHA 1964; MURTHY and RAPPOPORT 1965; ADAMS and LIM 1966; JOHNSON and LUTTGES 1966; MURTHY 1966; YAMAGAMI, FRITZ and RAPPOPORT 1966; JOHNSON 1967; BONDY and ROBERTS 1968; JOHNSON and BELYTSCHKO 1969; YAMAGAMI and MORI 197o).

Über höhere Syntheseraten nuclearer DNA und Proteine im unreifen Rattengehirn wurde vor kurzem berichtet. (J.A. BURDMAN 1972; BURDMAN, SZIJAN, FRANZONI and GARCIA ARGIZ 1973).
Die hohe Rate der Proteinsynthese in Zellkernen während der Ontogenese impliziert eine Beteiligung nuclearer Pro-

teine bei der Chromosomen-Replication und bei der Regulation der Transkription und somit der selektiven Realisierung genetischer Information.

Auch neoplastisches Gewebe zeigt eine höhere Incorporationsrate radioaktiver Aminosäuren in den nuclearen Proteinen als normales vergleichbares Gewebe. (BUSCH, DAVIS, ANDERSSON 1958; BUTLER, LAURENCE 1960; HAGLID 1972).

Weitere Studien in diese Richtungen sowie Charakterisierung der nuclearen Proteine durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese sind notwendig.

Von diesem Gesichtspunkt aus stellen unsere in vivo und in vitro Untersuchungen des nuclearen Proteinmetabolismus eine brauchbare Grundlage für zukünftige Studien dieser Art dar.

IV. MATERIAL UND METHODEN

a) Chemikalien

^{3}H-Leucin (spez. Aktivität 22 Ci/mMol), ^{3}H-Leucin (spez. Akt. 36 Ci/mMol), ^{3}H-Leucin (spez. Akt. 46,9 Ci/mMol) vom Radiochemical Centre Amersham, Buckinghamshire, England. ^{3}H-Tyrosin (spez. Akt. 31 Ci/mMol), ^{3}H-Lysin (spez. Akt. 3o Ci/mMol), ^{3}H-Glutaminsäure (spez. Akt. 15 Ci/mMol), ^{3}H-Asparaginsäure (spez. Akt. 18 Ci/mMol) vom Schwarz/Mann, Orangeburg, New York.

ATP, GTP, Phosphorenolpyruvat, Pyruvat-Kinase: Boehringer Mannheim GmbH.

Puromycin, Triton-X-1oo: Serva, Heidelberg.

Saccharose, Tris, Äthylenglykol, 2-Mercaptoäthanol, Desoxycholat: E. Merck AG, Darmstadt.

PPO, POPOP: Packard Instruments GmbH, Frankfurt/M.

Naphtalin, Dioxan: Riedel de Haen, Seelze-Hannover.

Alle anderen hier nicht aufgeführten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad: "pro analysi" bzw. "reinst".

Sämtliche Lösungen wurden mit Quarz-bidestilliertem Wasser angesetzt.

b) Versuchstiere

In allen Versuchen wurden weibliche Wistar-Ratten in den Gewichtsklassen von 12o bis 14o g benutzt.

Die Ratten erhielten Standardfutter (Altromin R) und Wasser ad libitum. Die Stalltemperatur betrug 25° C, die Luftfeuchtigkeit 5o bis 6o %.

Den Ratten wurde, im Interesse der Gewinnung reiner nuclearer Präparationen, 16 Stunden vor dem Versuchsbeginn, entsprechend den Angaben von SIEBERT 1968, die Nahrung vorenthalten.
Infolgedessen beziehen sich alle unsere Daten auf den Hungerstatus der Versuchstiere.

Die Tötung der Tiere erfolgte im Kühlraum durch Dekapitation, und die verwendeten Organe (Gehirn, Leber) wurden schnell herausoperiert.
Die gesamte Präparation wurde ebenfalls in der Kälte bei einer Temperatur von o bis 4 Grad Celsius durchgeführt.

c) Injektionen

Die Applikation der jeweiligen ^{3}H-markierten Aminosäure erfolgte durch einmalige intravenöse Injektion in die Schwanzvene der Ratte.
Die Dosis betrug 1 µCi/g Körpergewicht, das Injektionsvolumen 1 ml/1oo g Tier.

Für die autoradiographische Darstellung der Radioaktivitätsverteilung in vivo war eine Dosis von 3o µCi/g Körpergewicht ^{3}H-Leucin (spez. Akt. 46,9 Ci/mMol) - durch zwei intravenöse Injektionen in 3o min. Abstand appliziert - notwendig. Die Dekapitation der Tiere erfolgte 6o Min. nach der zweiten Injektion.

Das Puromycin (o,o1 mg/g Körpergewicht, in einem Gesamtvolumen von 5o µl) wurde den Ratten in Äther-Narkose intraventriculär injiziert, mittels einer 1oo µl-Hamilton-Spritze, die vorher auf 4 mm Penetrationsvermögen angepaßt war.
Der dazu notwendige Adaptor wurde in der Werkstatt des Pharmakologischen Instituts der FU von Herrn H. DIETZ angefertigt. Dafür sei ihm an dieser Stelle gedankt.

d) Zellfraktionierung

1. Kernpräparation

Kernisolierung in hochmolaren Saccharosemedien wurde zuerst von CHAUVEAU, MOULÉ and RUILLER, 1956 eingeführt.
Für unsere Versuche war das von FLEISCHER und REINSCH, 1971 angegebene Verfahren gut geeignet.

Nach Dekapitation und Eröffnung des Schädels vom Foramen magnum her wurde das Gehirn freigelegt und aus dem Schädel gelöst.
Nach Eröffnung des Abdomens wurde die Leber exstirpiert, nachdem sie vorher über die Vena portae mit o,9 % iger NaCl - Lösung perfundiert wurde.

Gehirn und Leber wurden mehrmals mit dem Homogenisationsmedium abgewaschen.
Das Homogenisationsmedium bestand aus:

Endkonzentration:	Saccharose	o,32 M
	$MgCl_2$	3,o mM
	Tris-HCl	o,o2 M

pH 6,75

Die Homogenisation erfolgte in einem locker sitzenden Plexiglas-Homogenisator vom Typ Potter-Elvehjem (POTTER and ELVEHJEM, 1936) bei 75o rpm (13 Auf- und Abwärtsbewegungen).
Das Homogenat wurde durch acht Lagen Mull filtriert, um gröbere Bestandteile zurückzuhalten und anschließend 1o Min. bei 14oo rpm in der MSE Mistral L 6 zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgegossen und das Sediment mit dem nicht-ionischen Detergenz Triton-X-1oo (o,5 % v/v) 45 sek. im Homogenisationsmedium behandelt.

Danach wurde 1o Min. bei 12oo rpm in der MSE Mistral L 6 zentrifugiert und das Sediment nochmals mit Saccharose-Lösung (o,32 M Saccharose; o,o2 M Tris; 3 mM $MgCl_2$; pH 6,75) gewaschen.

Die so gewonnene "rohe Zellkernfraktion" wurde ihrer Menge entsprechend in 2,4 M Saccharose + 1 mM $MgCl_2$ suspendiert, so daß eine 1,9 M Saccharose entstand, die eine kritische Dichte für Gehirnzellkerne darstellt. (Leber: 2,2 M).

Anschließend wurde 6o Min. bei 275oo rpm in der Ultrazentrifuge (BECKMAN SPINCO L 5o, ROTOR 4o) zentrifugiert und dann das Sediment ("reine Zellkernfraktion") in o,25 M Saccharose und 3 mM $CaCl_2$ aufgenommen.

Die Reinheit der so gewonnenen Kerne wurde im Phasenkontrast- und Elektronenmikroskop überprüft.

2. Präparation von Neuron- und Gliazellkernen

Aus quantitativen Gründen (neuronale Kernfraktion) waren pro Experiment 3o Gehirne erforderlich.

Die Gehirnzellkernfraktionierung erfolgte in einer diskontinuierlichen Gradienten-Ultrazentrifugation. Der Gradient

bestand aus: 3 ml 2,6 M, 15 ml 2,5 M, 1o ml 2,4 M und 2 ml 2,3 M Saccharose.

Die, wie oben angegeben, gereinigte Zellkernsuspension wurde in 2 ml 2 M Saccharose aufgenommen und auf den Gradienten gegeben.
Anschließend wurde 16o Min. bei 24ooo rpm im Schwingrotor SW 25 der spinco-L-5o Ultrazentrifuge zentrifugiert.
Es bildeten sich zwei gut gegeneinander abgegrenzte Kernschichten und zwar befand sich in der Trennlinie der 2,4 M und 2,5 M Saccharose eine Zellkernfraktion mit großen Kernen und aufgelockertem Nucleoplasma und in der Trennlinie der 2,5 M und 2,6 M Saccharose eine Kernfraktion mit kleineren und dichten Kernen.

Vergleiche mit entsprechenden Schnittpräparaten im Licht- und Elektronenmikroskop berechtigten den Schluß, daß die großen Kerne den Neuronen, die kleineren den Gliazellen angehören.

Zahlreiche Vorversuche mit kontinuierlichem Saccharose-Gradienten erwiesen sich als nicht erfolgreich, weil unscharfe Schichten gebildet wurden und sich von daher die Gewinnung homogener nuclearer Fraktionen schwierig gestaltete.

3. Ribosomenpräparation

Für unsere Versuche war das von MURTHY and RAPPOPORT, 1965 angegebene Verfahren gut geeignet.
Die Rattengehirne wurden routinemäßig mit dem zweifachen Volumen (g/ml) "Medium I" (o,2 M Saccharose, o,o35 M Tris,

o,o1 M $MgCl_2$, o,o25 M KCl, pH 7,8) in einem festsitzenden Plexiglas-Homogenisator vom Typ Potter-Elvehjem bei 14oo rpm homogenisiert (12 - 15 Auf- und Abwärtsbewegungen) und das Homogenat 7 Min. bei 95oo rpm in der Phywe-Eispirouette zentrifugiert.

Je 7,5 ml des Überstandes wurden mit 1,5 ml 2,5 M KCl + o,o1 M $MgCl_2$ und 1,o ml 1o %iger Na-Desoxycholatlösung versetzt, 2 Min. gerührt und 5 Min. bei 13ooo rpm in der Phywe-Eispirouette zentrifugiert.

Anschließend wurde der resultierende Überstand auf Medium II (o,4 M Saccharose, o,o35 M Tris, o,o1 M $MgCl_2$, o,5 M KCl, pH 7,8) gegeben und nach 9o Min. Zentrifugation bei 49ooo rpm in der Ultrazentrifuge (BECKMANN SPINCO L 5o, Rotor 5o Ti) wurde das Sediment in "Medium I" aufgenommen.

4. Hyaloplasma-Isolierung

Vier Gehirne wurden bei $+4^{o}$ C mit dem dreifachen Volumen (g/ml) "Standard-Puffer" in einem Plexiglas-Potter-Elvehjem-Homogenisator bei 14oo Umdrehungen pro Min. homogenisiert; das Homogenat wurde zunächst 12 Min. bei 12ooo rpm in der Phywe-Eispirouette und der Überstand anschließend 12o Min. bei 49ooo rpm in einer präparativen Ultrazentrifuge (Beckman Spinco L 5o, Rotor 5o Ti) zentrifugiert.

Der klare partikelfreie Überstand, der nach der letzten Zentrifugation gewonnen wurde, stellt die 1o5ooo X g-Hyaloplasma-Fraktion dar.

Standard-Puffer (WEINSTEIN, OCHOA, FRIEDMAN 1966)

Endkonzentration:	$Mg(CH_3COO)_2$	o,oo5 M
	KCl	o,o6 M
	Tris-HCl	o,o1 M
	2-Mercaptoäthanol	o,oo6 M

pH 7,8

e) Ansatz zur Messung der nuclearen Proteinsynthese

Der Incubationsansatz (1 ml - System oder o,5 ml - System, pH 6,75) enthielt:

Angabe für o,5 ml - System

o,125 ml Kernsuspension	o,8 ± o,1	mg Protein
	o,25 ± o,o5	mg DNA
	o,o23 ± o,ooo5	mg RNA

^{3}H-Leucin oder ^{3}H-Tyrosin oder ^{3}H-Lysin oder ^{3}H-Asparaginsäure oder ^{3}H-Glutaminsäure.

Die Dosis der jeweilig getesteten Aminosäure sowie deren spezifische Aktivität wurden bereits bei der Beschreibung unserer Ergebnisse angegeben.

o,o63 ml der 1o5ooo X g - Gehirnhyaloplasma - Fraktion (o,35 ± o,o1 mg Protein).

Natrium-Phosphat-Puffer	25	mM	pH 6,75
Saccharose	62,5	mM	
Glucose	2o	mM	
NaCl	6o	mM	
$MgCl_2$	7,5	mM	
ATP	o,o5	mM	
GTP	1	mM	
GSH	1,5	mM	
Phosphorenolpyruvat	3	mM	
o,oo2 ml Pyruvat-Kinase (1o mg/ml)			
Gemisch aus 2o inaktiven Aminosäuren, davon jede	o,o5	mM	

Die Proben wurden bei 37° C im Schüttel-Wasserbad incubiert.

f) Ansatz zur Messung der ribosomalen Proteinsynthese

Der Incubationsansatz (o,5 ml - System, pH 7,8) enthielt:

o,1 ml Ribosomensuspension	o,134 ± o,1	mg Protein
	o,o3o ± o,o2	mg RNA

3 µCi ^{3}H-Leucin (spez. Aktivität 36 Ci/mMol)

o,o75 ml der 1o5ooo X g - Gehirnhyaloplasma - Fraktion

Tris-HCl	4o	mM	pH 7,8
$MgCl_2$	7,5	mM	
KCl	6o	mM	
ATP	1,o	mM	
GTP	o,25	mM	
GSH	1,o	mM	
Phosphorenolpyruvat	1o	mM	

o,o15 ml Pyruvat-Kinase (1o mg/ml)

Gemisch aus 2o inaktiven Aminosäuren, davon jede	o,o5	mM

Die Proben wurden bei 37° C im Schüttel-Wasserbad incubiert.

g) Durchführung der Incubation bei 37° C

Zur Bestimmung der in das Protein incorporierten ^{3}H-markierten Aminosäure wurde eine modifizierte Prozedur der von MANS und NOVELLI 196o angegebenen Methode angewandt.

Die Reaktion wurde gestartet, indem wir zu einem gegebenen Zeitpunkt Kern- bzw. Ribosomensuspension zum entsprechenden Incubationsansatz zugaben.

Daraus entnahmen wir zu gegebener Zeit nach gründlicher

Durchmischung o,1 ml. Dieses Aliquot wurde auf einen vorbehandelten Rundfilter (2,5 cm Ø) pipetiert.

Die Filterplättchen wurden 2o sek. in heißer Luft getrocknet und das TCA-unlösliche Protein wurde dann mit dem eiskalten 1o %igen TCA-Aminosäure-Gemisch in die Matrize der Zellulose-Fasern gefällt.
Die Ansätze wurden anschließend im Schüttel-Wasserbad bei 37° C incubiert.

Es ist wichtig, das erste Mal nach dem Abstoppen der Reaktion die Wasch-TCA zu erneuern, da anderenfalls ungebundene Radioaktivität an die Plättchen absorbiert werden kann.

Die Plättchen wurden 6o Min. mit dem TCA-Aminosäure-Gemisch gewaschen und anschließend 3o Min. bei 9o° C in 5 %ige TCA gebracht, um RNA zu hydrolysieren und zu extrahieren, dann 3o Min. bei 37° C in Äther/Äthanol/Chloroform 2:2:1 um TCA und Lipide zu entfernen, und zuletzt in Äther 1o Min. bei Zimmertemperatur gebracht, um weitere Lipide und das Wasser zu entfernen.-
Zwischen diesen Vorgängen wurden die Plättchen auf Filterpapier ausgebreitet, um anhaftende Flüssigkeit abzusaugen.

Filterplättchenvorbehandlung:
Plättchen (für die in vitro Versuchsanordnung kreisrund 2,5 cm Ø, für die in vivo Untersuchungen viereckig 4 x 4,5 cm) aus Whatman Filterpapier Nr. 3 wurden 12 Stunden in 1o %iger TCA + o,o1 M inaktiver Aminosäure getränkt.
Anschließend wurden sie zwischen Filterpapier getrocknet.

h) Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität wurde in einem Packard-Tricarb-Liquid-Szintillation-Counter Modell 3o8o gemessen.
Als Zählgemisch für die Plättchen diente Dioxan p.a., in welchem pro Liter gelöst wurden:

Szintillationsgemisch:	4	g	PPO
	o,2	g	POPOP
	6o	g	Naphtalin
	2o	ml	Äthylenglykol
	1oo	ml	Methanol

Jedes einzelne Plättchen der in vitro Untersuchungen wurde in 1o ml Szintillationsgemisch gezählt.

Bei den in vivo Versuchen pipetierten wir o,5 ml der "reinen Zellkernfraktion" auf ein vorbehandeltes viereckiges Plättchen (4 x 4,5 cm), welches dann 6o sek. geföhnt und in eiskalte TCA gegeben wurde.

Die Waschprozedur der Plättchen erfolgte wie bereits oben bei der in vitro Versuchsanordnung angegeben wurde.

Jedes einzelne Plättchen der in vivo Untersuchungen wurde in 15 ml Szintillationsgemisch gezählt.

i) Analytische Methoden (RNA-, DNA- und Proteinbestimmung)

Der RNA-Gehalt wurde als Ribose mit der Orcin-Methode (DISCHE, CHARGAFF and DAVIDSON 1955), der DNA-Gehalt mit Diphenylamin und Acetaldehyd (BURTON 1956) bestimmt.

Die Zellkernfraktionen wurden hierzu nach der von OGUR und ROSEN 195o angegebenen Methode mit o,2N Perchlorsäure bei o° C gewaschen und die Nucleinsäuren extrahiert. (RNA: 18 Std. mit 1,oN Perchlorsäure in der Kälte; DNA: 15 Min. bei 75° C mit o,5N Perchlorsäure).

Die Proteinbestimmung (nach Ausfällen mit 1o %iger TCA und anschließendem Lösen in 1N NaOH) erfolgte entsprechend den Angaben von LOWRY, ROSENBROUGH, FARR und RANDALL 1951.

j) Autoradiographische Technik

Kernsediment mit 3 %iger Glutaraldehyd-Lösung (Michaelis-Puffer, pH 7,2 gepuffert) fixiert.

Kernsedimente nach der Fixierung 3 x mit o,9 %iger NaCl gewaschen.

Das Sediment wurde auf den Objektträger aufgetragen, dieser in der Emulsion K5 Ilford (verdünnt 1:1 mit dest. H_2O) getippt und anschließend 4 Stunden in der Luft getrocknet.

Expositionszeit: siehe Legende der jeweiligen Autoradiogramme.

Entwicklung: 2o Min. mit 1,125 g Amidol (4-Hydroxy-m-phenylen-diammoniumdichlorid Krist., Merck-Darmstadt) + 2 ml 1o% KBr + Na-Sulfit 4,5 g frisch angesetzt!

Fixierung: 2o Min.
Färbung: Hämalaun Krist., Merck-Darmstadt

k) Elektronenmikroskopische Technik

Die Fraktionen wurden mit 3 proz. Glutaraldehyd-Lösung (mit Michaelis-Puffer, pH 7,2 gepuffert) und OsO_4-Lösung fixiert und in Mikropal eingebettet.

Schnitte: LKB- und Servall-Mikrotome.
Kontrastierung: Uranylacetat oder Bleihydroxid.
Aufnahmen: Siemens-Elmiskop I.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Proteinsynthese in Zellkernen aus dem Gehirn erwachsener Ratten wurde unter in vivo und in vitro Bedingungen untersucht.
Die Reinheit der Kernpräparationen wurde mit optischen und analytischen Methoden überprüft.

1. In vivo Studien:

a. Nach einer intravenösen Injektion von 1 µCi/g wies ^{3}H-Leucin von mehreren getesteten Aminosäuren die höchste Einbaurate in den nuclearen Proteinen von Gehirn und Leber der Ratte auf.
Auf die Bedeutung der Permeabilitätsverhältnisse der Blut-Gehirn-Schranke bei der Incorporation verschiedener radioaktiver Aminosäuren in die cerebralen Proteine wurde eingegangen.

b. Zum Vergleich wurde die extranucleäre ribosomale Proteinsynthese untersucht.
Wir fanden bei 15 Min. nach der Applikation von ^{3}H-Leucin eine um 2,14 mal höhere Incorporationsrate in der ribosomalen als in der nuclearen Fraktion. Der Quotient nimmt mit der Zeit ab.

c. Mit Hilfe der diskontinuierlichen Saccharosegradienten-Zentrifugation ist es uns gelungen, eine befriedigende Trennung neuronaler von glialen Nuclei durchzuführen. Die

Kernfraktionen wurden durch das Protein/DNA-Verhältnis charakterisiert. Die Relation beträgt bei den Gliakernen 2,53; bei den Neuronkernen 4,12.
Wir fanden nach intravenöser Applikation von ^{3}H-Leucin eine um 1,8 mal höhere Incorporationsrate bei den neuronalen als bei den glialen nuclearen Proteinen.

d. Nach intraventriculärer Applikation von Puromycin wurde eine fast 5o %ige Hemmung der Incorporation von ^{3}H-Leucin in die nuclearen Proteine des Rattengehirns festgestellt.

2. In vitro Studien:

a. Morphologisch intakte und metabolisch aktive Nuclei aus Gehirn und Leber der Ratte sind zur Incorporation ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Trichloressigsäure-unlöslichen Proteine fähig.
^{3}H-Leucin zeigte von mehreren getesteten Aminosäuren die höchste Einbaurate.
Gehirnzellkerne waren um 2,3 bis 3,6 mal aktiver als Leberzellkerne.
Mit ansteigenden Radioaktivitätsmengen im Incubationsmedium wurde eine Zunahme der Incorporation festgestellt.

b. Die ribosomale Proteinsynthese wurde untersucht, und quantitative Vergleiche mit nuclearen Präparationen ergaben eine um 9,5 mal höhere Einbaurate in den ribosomalen als in den nuclearen Proteinen.

c. Nach Applikation von Puromycin im Incubationsmedium wurde eine über 9o %ige Hemmung der Incorporation beobachtet.

3. Autoradiographische Untersuchungen wurden durchgeführt. Hohe spezifische Aktivitäten des radioaktiven Praekursors waren notwendig. Nuclei nach Incubation in vitro mit ^{3}H-Leucin ergeben qualitativ ein sehr ähnliches Muster der Radioaktivitätsverteilung wie Nuclei, die nach intravenöser Injektion von ^{3}H-Leucin aus der Ratte erhalten wurden.

4. Es wurde angenommen, daß die intranucleäre Proteinsynthese mit ähnlichen, wenn nicht identischen Mechanismen wie in den mikrosomalen Systemen des Cytoplasmas abläuft und es mehrere Orte der Proteinsynthese innerhalb des Nucleus gibt.

IV. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ADAMS, D.H. and LIM, L.: Biochem.J. 99, 261 (1966)
   Amino acid incorporation by preparations from the developing rat brain.

2. ALLFREY, V.G., LITTAU, V.C. and MIRSKY, A.E.: Cell Biol. 21, 213 (1964)
   Methods for the purification of thymus nuclei and their application to studies of nuclear protein synthesis.

3. ALLFREY, V.G., MEUDT, R., HOPKINS, J.W. and MIRSKY, A.E.: Proc. Nat. Acad. Sci., USA 47, 9o7 (1961)
   Sodium-dependent 'transport' reactions in the cell nucleus and their role in protein and nucleic acid synthesis.

4. ALLFREY, V.G., MIRSKY, A.E. and OSAWA, S.: J. gen. Physiol. 4o, 451 (1957)
   Protein synthesis in isolated cell nuclei.

5. ALLFREY, V.G., STERN, H., MIRSKY, A.E. and SAETREN, H.: J. gen. Physiol. 35, 529 (1952)
   The isolation of cell nuclei in non aqueous media.

6. ALTMAN, J.: Science, N.Y. 135, 1127 (1962)
   Are new neurons formed in the brain of adult mammals?

7. BARONDES, S.H.: J. Neurochem. 11, 663 (1964)
   Studies with an RNA polymerase from brain.

8. BEHRENS, M.: Z. physiol. Chem. 2o9, 59 (1932)
   Untersuchungen an isolierten Zell- und Gewebsbestandteilen. 1. Mitteilung: Isolierung von Zellkernen des Kalbsherzmuskels.

9. BIRNSTIEL, M.L. and HYDE, B.B.: J. Cell Biol. 18, 41 (1963)
   Protein synthesis by isolated pea nucleoli.

1o. BONDY, S.C., ROBERTS, S.: Biochem. J. 1o5, 1111 (1967)
   Messenger ribonucleic acid of cerebral nuclei.

11. BONDY, S.C., ROBERTS, S.: Biochem. J. 1o9, 533 (1968)
   Hybridizable ribonucleic acid of rat brain.

12. BONDY, S.C., ROBERTS, S.: Biochem. J. 115, 341 (1969)
   Developmental and regional variations in ribonucleic acid synthesis on cerebral chromatin.

13. BONDY, S.C., WAELSCH, H.: J. Neurochem. 12, 751 (1965)
Nuclear RNA polymerase in brain and liver.

14. BONNER, J., DAHMUS, M.E., FAMBROUGH, D., HUANG, R.C.C., MARUSHIGE, K., TUANG, D.Y.H.: Science 159, 47 (1968)
The biology of isolated chromatin.

15. BURDMAN, J.A.: J. Neurochem. 17, 1555 (197o)
Incorporation in vivo of radioactive leucine into neuronal and glial nuclear proteins of rat brain.

16. BURDMAN, J.A.: J. Neurochem. 19, 1459 (1972)
The relationship between DNA synthesis and the synthesis of nuclear proteins in rat brain during development.

17. BURDMAN, J.A. and JOURNEY, L.J.: J. Neurochem. 16, 493 (1969)
Protein synthesis in isolated nuclei from adult rat brain.

18. BURDMAN, J.A., SZIJAN, I, FRANZONI, L. and GARCIA-ARGIZ, C.A.: J. Neurochem. 2o, 1719 (1973)
The relationship between DNA synthesis and nuclear proteins in the cerebrum and cerebellum of 8-day-old rats.

19. BURTON, K.: Biochem. J. 62, 315 (1956)
A study of the conditions and mechanism of the reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.

2o. BUSCH, H.: Histones and Other Nuclear Proteins, Academic Press, New York, 1965, S. 211

21. BUSCH, H., DAVIS, J.R. and ANDERSON, D.C.: Cancer Res. 18, 916 (1958)
Labeling of histones and other nuclear proteins with L-lysine-^{14}C in tissues of tumor-bearing rats.

22. BUTLER, J.A.V. and LAURENCE, D.J.R.: Br. J. Cancer 14, 758 (196o)
Relative metabolic activities of histones in tumours and liver.

23. CASPERSSON, T.: Cell Growth and Cell Function, Academic Press, New York, 195o

24. CHAUVEAU, J., MOULÉ, Y. and ROUILLER, Ch.: Exptl. Cell Res. 11, 317 (1956)
Isolation of pure and unaltered liver nuclei morphology and biochemical composition.

25. DEISSEROTH, A.: Biochem. Biophys. Acta 186, 392 (1969)
Effect of puromycin and cortisol pretreatment on the uptake of (^{14}C)leucine into the globulins, whole histones and residual protein of the rat-liver nucleus.

26. DIGIROLAMO, A., HENSHAW, E.C. and HIATT, H.H.: J. molec. Biol. 8, 479 (1964)

Messenger ribonucleic acid in rat liver nuclei and cytoplasm.

27. DISCHE, Z., in: E. CHARGAFF and J.N. DAVIDSON: The Nucleic Acid, Vol. I, Academic Press, New York, 1955, p. 285

28. FLANGAS, A.L. and BOWMAN, R.E.: J. Neurochem. 17, 1237 (197o)

Differential metabolism of RNA in neuronal-enriched and glial-enriched fractions of rat cerebrum.

29. FLEISCHER-LAMBROPOULOS, H. und REINSCH, I.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352, 593 (1971)

Proteinbiosynthese in Rattenhirnzellkernen.

3o. FRENSTER, J.H., ALLFREY, V.G., MIRSKY, A.E.: Proc. Nat. Acad. Sci., USA 46, 432 (196o)

Metabolism and morphology of ribonucleoprotein particles from the cell nucleus of lymphocytes.

31. GAITONDE, M.K. and RICHTER, D.: Proc. Roy. Soc. B. 145, 83 (1956)

The metabolic activity of the proteins of the brain.

32. GALLWITZ, D., MUELLER, G.C.: Eur. J. Biochem. 9, 431 (1969)

Protein synthesis in nuclei isolated from HeLa cells.

33. GILBERT, W.: J. mol. Biol. 6, 389 (1963)

Polypeptide synthesis in Escherichia coli. II. The polypeptide chain and s-RNA

34. GOLDSTEIN, L.: Advanc. Cell Biol. 1, 187 (197o)

On the question of protein synthesis by cell nucleus.

35. GRANGER, N.A.: Abstr. Biophys. Soc. 135 (1969)

Protein synthesis in isolated nuclei of Rana pipiens embryos.

36. GUROFF, G. and ABRAMOWITZ, A.: Anal. Biochem. 19, 548 (1967)

A simple radioactive assay for phenylalanine hydroxylase.

37. HADJIOLOV, A.A., TENCHEVA, Z.S. and BOJADJIEVA-MIKHAILOVA, A.G.: J. Cell Biol. 26, 383 (1965)

Isolation and some characteristics of cell nuclei from brain cortex of adult cat.

38. HAGLID, K.G.: J. Neurochem. 19, 19 (1972)

Protein synthesis in vitro in nuclei of human nervous tissue.

39. HAMBERGER, A., BLOMSTRAND, C. and LEHNINGER, A.L.: J. Cell Biol. 45, 221 (197o)

Comparative studies on mitochondria isolated from neuron-enriched and glia-enriched fractions of rabbit and beef brain.

4o. HAMBERGER, A., BLOMSTRAND, C. and YANAGIHARA, T.: J. Neurochem. 18, 1469 (1971)

Subcellular distribution of radioactivity in neuronal and glial-enriched fractions after incorporation of (^{3}H)leucin in vivo and in vitro.

41. HAMMEL, C.L. and BESSMAN, S.P.: J. Biol. Chem. 239, 2228 (1964)

Hemoglobin synthesis in avian erythrocytes.

42. HELMSING, P.J.: Biochim. Biophys. Acta 224, 579 (197o)

Protein synthesis of polytene nuclei in vitro.

43. HNILICA, L.S. in: Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology (J.N. DAVIDSON and W.E. COHN, eds.), Vol. 7, pp. 25-1o6, Academic Press, New York (1967)

44. HOPKINS, J.W.: Proc. Nat. Acad. Sci., USA 45, 1461 (1959)

Amino acid activation and transfer to ribonucleic acids in the cell nucleus.

45. HULTIN, T.: Exp. Cell Res. 1, 376 (195o)

Incorporation in vivo of ^{15}N-labeled glycine into liver fractions of newly hatched chicks.

46. HYDÉN, H. and EGYHAZI, E.: Proc. Nat. Acad. Sci., USA 52, 1o3o (1964)

Changes in RNA content and base composition in cortical neurons of rats in a learning experiment involving transfer of handedess.

47. INAMURA, H., KATO, T. and KUROKAWA, M.: Proc. Japan Acad. 44, 974 (1968)

Protein synthesis in isolated neuronal, glial and liver nuclei.

48. JOHNSON, T.C. and LUTTGES, M.W.: J. Neurochem. 13, 545 (1966)

The effects of maturation on in vitro protein synthesis by mouse brain cells.

49. JOHNSON, T.C.: J. Neurochem. 15, 1189 (1968)

Cell-free protein synthesis by mouse brain during early development.

5o. JOHNSON, T.C. and BELYTSCHKO, G.: Proc. Nat. Acad. Sci., USA 62, 844 (1969)

Alteration in microsomal protein synthesis during early development of mouse brain.

51. KARLSON, P., SEKERIS, C.E.: Dtsch.med.Wschr. 98, 831 (1973)

Wirkungsmechanismus der Steroidhormone.

52. KATO, T.: Proc. Japan Acad. 44, 748 (1968)
Different properties of polyribonucleotide polymerizing activity in neuronal, glial, and liver nuclei.

53. KATO, T. and KUROKAWA, M.: J. Cell Biol. 32, 649 (1967)
Isolation of cell nuclei from the mammalian cerebral cortex and their assortment on a morphological basis.

54. KUROKAWA, M., KATO, T. and INAMURA, H.: Proc. Japan Acad. 42, 1217 (1966)
Unequal distribution of ATP : NMN adenylyltransferase activity among neuronal and glial cell nuclei.

55. LAHIRI, S. and LAJTHA, A.: J. Neurochem. 11, 77 (1964)
Cerebral amino acid transport in vitro - I. Some requirements and properties of uptake.

56. LAJTHA, A.: Intern. Rev. Neurobiol. 6, 1 (1964)
Protein metabolism of the nervous system.

57. LAJTHA, A.: Intern. Rev. Neurobiol. 7, 1 (1965)
Alteration and pathology of cerebral protein metabolism.

58. LAJTHA, A. in: Neurochem. (K.A.C. ELLIOTT, I.H. PAGE and H.J. QUASTEL, eds.) (1962) p. 399

59. LOGAN, R., FICQ, A. and ERRERA, M.: Biochim. Biophys. Acta 31, 402 (1959)
The uptake of (8-^{14}C)adenine and (2-^{14}C)phenylalanine by rat liver nuclei in vitro.

60. LØVTRUP-REIN, H.: Brain Res. 19, 433 (1970)
Protein synthesis in isolated nuclei of nerve and glial cells from rat brain.

61. LØVTRUP-REIN, H.: J. Neurochem. (1970 in press)
Synthesis of nuclear RNA in nerve and glial cells.

62. LØVTRUP-REIN, H. and GRAHN, B.: J. Neurochem. (1970 in press)
Newly synthesized RNA in nuclei isolated from nerve and glial cells.

63. LØVTRUP-REIN, H. and McEWEN, B.S.: J. Cell Biol. 30, 405 (1966)
Isolation and fractionation of rat brain nuclei.

64. LOWRY, H.O., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, R.J.: J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent.

65. MANS, R.J., NOVELLI, G.D.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 54o (196o)

A convenient, rapid and sensitive method for measuring the incorporation of radioactive amino acids into protein.

66. MAGGIO, R.: Biochim. Biophys. Acta 119, 641 (1966)

Some properties of isolated nucleoli from guinea-pig liver.

67. McCARTY, K.S., PARSONS, J.T., CARTER, W.A. and LASZLO, J.: J. Biol. Chem. 241, 5489 (1969)

Protein-synthetic capacities of liver nuclear subfractions.

68. McEWEN, B.S. and ZIGMOND, R.E. in: Research Methods in Neurochemistry (Eds. N. MARKS and R. RODNIGHT) Vol. 1, Plenum Press, New York - London (1972) p. 139 - 161

69. MILLER, S.A. in: Mammalian Protein Metabolism (Ed. H.N. MUNRO) Vol. 3, Academic Press, New York (1969) p. 2oo

7o. MORRIS, A.J. and SCHWEET, R.S.: Biochim. Biophys. Acta 47, 415 (1961)

Release of soluble protein from reticulocyte ribosomes.

71. MURTHY, M.R.V.: Biochim. Biophys. Acta 119, 599 (1966)

Protein synthesis in growing-rat tissues. II. Polyribosome concentration of brain and liver as a function of age.

72. MURTHY, M.R.V. and RAPPOPORT, D.A.: Biochim. Biophys. Acta 95, 121 (1965)

Biochemistry of the developing rat brain. V. Cell-free incorporation of L-(I-^{14}C)leucin into microsomal protein.

73. MURTHY, M.R.V. and RAPPOPORT, D.A.: Biochim. Biophys. Acta 95, 132 (1965)

Biochemistry of the developing rat brain. VI. Preparation and properties of ribosomes.

74. NATHANS, D.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 51, 585 (1964)

Puromycin inhibition of protein synthesis: Incorporation of puromycin into peptide chains.

75. NEUBERGER, A. and RICHARDS, F.F. in: Mammalian Protein Metabolism (H.N. MUNRO and J.B. ALLISON, eds.) Vol. 1, Academic Press, New York (1964) p. 243 - 296

76. NURNBERGER, J.I. in: Biology of Neuroglia (W.F. WINDLE, ed.) C.C.Thomas, Springfield, Illinois (1958) p. 193

77. OGUR, M. and ROSEN, G.: Arch. Biochem. 25, 262 (195o)

The nucleic acids of plant tissue: I. The extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid.

78. OLDENDORF, W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Medic. 136, 385 (1971)

Uptake of radiolabeled essential amino acids by brain following arterial injection (3527o).

79. OLDENDORF, W.: Americ. J. Physiol. (1971 in press)

Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines and hexoses following arterial injection.

8o. ONO, H. and TERAYAMA, H.: Biochim. Biophys. Acta 166, 175 (1968)

Amino acid incorporation into proteins in isolated rat liver nuclei.

81. OSAWA, S., ALLFREY, V.G. and MIRSKY, A.E.: J. Gen. Physiol. 4o, 491 (1957)

Mononucleotides of the cell nucleus.

82. PATEL, G. and WANG, T.Y.: Biochim. Biophys. Acta 95, 314 (1965)

Protein synthesis in nuclear residual protein.

83. POTTER, V.R. and ELVEHJEM, C.A.: J. Biol. Chem. 114, 495 (1936)

A modified method for the study of tissue oxidations.

84. RAPPOPORT, D.A. and DAGINAWALA, H.F.: J. Neurochem. 15, 991 (1968)

Changes in nuclear RNA of brain induced by olfaction in catfish.

85. RAPPOPORT, D.A., MAXCY, P. and DAGINAWALA, H.F.: in Handbook of Neurochemistry (Ed. A.L. LAJTHA) Vol. 2 (1969) p. 241 - 254

86. REES, K.R. and ROWLAND, G.F.: Biochem. J. 78, 89 (1961)

The metabolism of isolated rat-liver nuclei.

87. REID, B.R. and COLE, R.D.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 51, 1o44 (1964)

Biosynthesis of a lysine-rich histone in isolated calf thymus nuclei.

88. REID, B.R., STELLWAGEN, R.H., COLE, R.D.: Biochim. Biophys. Acta 155, 593 (1968)

Further studies on the biosynthesis of very lysine-rich histones in isolated nuclei.

89. RENDI, R.: Exp. Cell Res. 19, 489 (196o)

In vitro incorporation of labeled amino acids into nuclei isolated from rat liver.

9o. ROBERTS, S., ZOMZELY, C.E. and BONDY, S.C.: in Protein Metabolism of the Nervous System (Ed. by LAJTHA, A.) Plenum Press, New York (197o) p. 3

91. ROSE, S.P.R.: Biochem. J. 1o2, 21 P (1967)

Amino acid metabolism in isolated neuronal and glial cells.

92. ROSE, S.P.R. in: Applied Neurochemistry (Eds. DAVISON, A.N. and DOBBING, J.) Blackwell, Oxford (1968) p. 332

93. ROSE, W.C., OESTERLING, M.J. and WOMACK, M.: J. Biol. Chem. 176, 753 (1948)

Comparison of growth on diets containing 1o and 19 amino acids with further observations upon the role of glutamic and aspartic acids.

94. SEKERIS, C.E., SCHMID, W., GALLWITZ, D. and LUKACS, I.: Life Sci. 5, 969 (1966)

Protein synthesis in the cell nucleus. I. Amino acid incorporation into protein by the aggregate enzyme of Weiss.

95. SEKERIS, C.E., SCHMID, W., GALLWITZ, D. and LUKACS, I.: Angew. Chem. 11, 6o1 (1966)

Proteinsynthese in Rattenleber-Chromatin und Chromatin-Fraktionen.

96. SIEBERT, G.: Nucleus. In: Comprehensive Biochemistry (Eds. E. STOTZ and M. FLORKIN) Vol. 23, p. 4, Amsterdam (1968)

97. SIEBERT, G., HUMPHREY, G.B., THEMAN, H., KERSTEN, W.: Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 34o, 51 (1965)

Neue Kriterien zur Beurteilung isolierter Zellkerne.

98. SJÖSTRAND, F.S.: The endoplasmic reticulum. In: Cytology and Cell Physiology (Ed. G.H. BOURNE) Academic Press, New York - London (1964)

99. SPORN, M.B., WANKO, T. and DINGMAN, W.: J. Cell Biol. 15, 1o9 (1962)

The isolation of cell nuclei from rat brain.

1oo. TSUZUKI, J.: Biochim. Biophys. Acta 182, 55o (1969)

The effect of monovalent cations on the incorporation of various amino acids in protein synthesis by isolated rat spleen nuclei.

1o1. TREVITHICK, J.R.: Biophys. Res. Commun. 36, 728 (1969)

Biosynthesis of nuclear proteins in embryos of rainbow trout.

1o2. TSUZUKI, J. and NAORA, H.: Biochim. Biophys. Acta 169, 55o (1968)

Protein synthesis in isolated rat spleen nuclei.

1o3. UETE, T.: J. Biochem. Tokyo, 61, 251 (1967)
Comparison of amino acid incorporation into nuclear protein of rat liver and thymus in cell free system.

1o4. WAELSCH, H. and LAJTHA, A.: Physiol. Rev. 41, 7o9 (1961)
Protein metabolism in the nervous system.

1o5. WANG, T.Y.: Biochim. Biophys. Acta (Amsterdam) 49, 1o8 (1961)
Incorporation of ^{14}C amino acids into ribonucleoprotein fraction of isolated thymus cell nuclei.

1o6. WANG, T.Y. and PATEL, G.: Life Sci. 6, 413 (1967)
Amino acid incorporation system of the nuclear residual acidic proteins.

1o7. WATSON, M.L.: J. Biophys. Biochem. Cytol. 1, 257 (1955)
The nuclear envelope. Its structure and relation to cytoplasmic membranes.

1o8. WEINSTEIN, I.B., OCHOA, M., FRIEDMANN, S.M.: Biochemistry 5, 3332 (1966)
Fidelity in the translation of messenger ribonucleic acids in mammalian subcellular systems.

1o9. WESER, U. und KOOLMAN, J.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 35o, 1273 (1969)
Untersuchungen zur Proteinsynthese in Rattenleber-Zellkernen.

11o. WILSON, S.H. and HOAGLAND, M.B.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 54, 6oo (1965)
Studies on the physiology of rat liver polyribosomes: Quantitation and intracellular distribution of ribosomes.

111. WINCKELMANS, D., HILL, M., ERRERA, M.: Biochim. Biophys. Acta (Amsterdam) 8o, 52 (1964)
Ribosomes from HeLa cells.

112. YAMAGAMI, S., FRITZ, R.R. and RAPPOPORT, D.A.: Biochim. Biophys. Acta 129, 532 (1966)
Biochemistry of the developing rat brain. VII. Changes in the ribosomal system and nuclear RNAs.

113. YAMAGAMI, S. and MORI, K.: J. Neurochem. 17, 721 (197o)
Changes in polysomes of the developing rat brain.

114. YARMOLINSKY, M.B., de la HABA, G.L.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 45, 1721 (1959)
Inhibition by puromycin of amino-acid incorporation into protein.

115. YOSHINO, Y., ELLIOTT, K.A.C.: Can. J. Biochem. 48, 228 (197o)
Incorporation of carbon atoms from glucose into free amino acids in brain under normal and altered conditions.

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von 1.9.1971 bis 31.8.1972 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. H. HERKEN im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.

Herrn Professor HERKEN möchte ich für sein Interesse sowie für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Arbeit sehr herzlich danken.
Herr Professor MERKER hat freundlicherweise die morphologische Beschaffenheit der isolierten Zellkernfraktionen kontrolliert. Ich möchte auch ihm an dieser Stelle recht herzlich danken.
Frau Dr. H. FLEISCHER bin ich besonders dankbar für die Einführung in die Methodik und für zahlreiche kritische Diskussionen und nützliche Hinweise.
Mein Dank gilt außerdem Fräulein I. REINSCH für technische Assistenz und Fräulein WOHLFEIL für die Entwicklung der Autoradiogramme.
Allen Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts danke ich dafür, daß sie sich stets freundlich und hilfsbereit zeigten.

Am 1. Februar 1942 wurde ich, Apostolos Constantin Voulgaris, als zweiter Sohn des Kaufmanns Constantin Georg Voulgaris und seiner Ehefrau Maria, geb. Moraitopoulos, in Volos/Griechenland geboren.

Das Abitur legte ich im Jahre 1959 in Volos ab.

Seit 1961 befinde ich mich in der Bundesrepublik Deutschland, wo ich nach Erlernen der deutschen Sprache am Goethe-Institut in Radolfzell/Bodensee zunächst das Studium des Maschinenbaus an der TH zu Braunschweig angefangen habe.

Ich wechselte dann nach Berlin über, um dort Humanmedizin an der Freien Universität zu studieren.

Die ärztliche Vorprüfung legte ich im Sommer 1967 ab.

Das medizinische Staatsexamen bestand ich im Frühjahr 1971.

Danach war ich ein Jahr am Pharmakologischen Institut der FU als Medizinalassistent. In dieser Zeit habe ich meine Doktorarbeit fertiggestellt. Anschließend war ich für vier Monate an der Medizinischen Klinik und weitere vier Monate an der Chirurgischen Klinik des Klinikums Westend tätig.

Seit Juli 1973 bin ich als Assistenzarzt an der chirurgischen Abteilung des St. Hildegard Krankenhauses in Berlin beschäftigt.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3 12 88 85 - 3 13 81 98